



Bm

(57)要約

標的RNAに対してアロステリックなRNA切断活性を示す核酸酵素。前記核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクター。前記の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターDNAを鋳型として、RNAに転写することを特徴とする、前記の核酸酵素の製造方法。前記核酸酵素または前記核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物。および、前記核酸酵素を用いて、標的RNAを特異的に切断する方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(修訂済版)

[illegible]

(51) 國際特許分類6 (11) 國際公開番号 WO99/46388

C12N 15/55, 9/22, C12Q 1/34, A61K 48/00. 38/43

(11) 國際公開番号

**W099/46388**

(43) 国際公開日 1999年9月16日(16.09.99)

1999年9月16日(16.09.99)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01187  
一入章夫(HITOSHI, AKIO)[JP/JP]

〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号

(22) 国際出版日  
1999年3月11日(11.03.99) 大正製薬株式会社内 Tokyo, (JP)

(74) 代理人

特選平10/60969  
1998年3月12日(12.03.98)  
井理士 平本祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.)  
三106 0001 本表知持印者, 照: 工口: 0550

特願平10/311098  
1998年10月30日(30.10.98)  
JP  
出/明555ビル3階 Tokyo (TM)  
1105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目1番1号

[illegible]

(7I) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

大正製菓株式会社  
TAKIHO BAKERY MANUFACTURING CO., LTD. TOKYO

(TAISHU PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]  
〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 Tokyo (JP)  
添付公明書欄

工業技術院長が代表する日本国

(JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL

OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND  
TECHNOLOGY (ICSTI)

TECHNOLOGY [P/F/F]  
〒100-8921 東京都千代田区豊田4丁目3番1号 Tokyo (JP)

(72) 発明者 ; および

(75) 発明者／出願人 (米国についてのみ)

多比良和誠(TAIRA, Kazumari)[JP/JP]

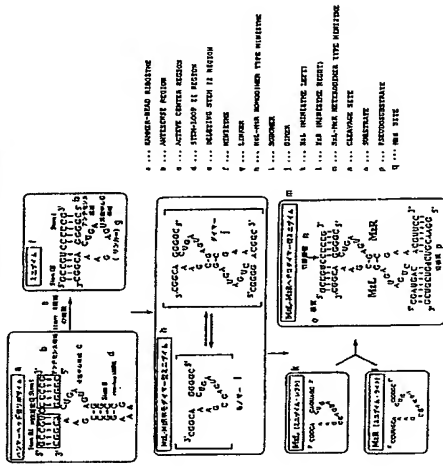
〒305-0046 茨城県つくば市東2丁目4番29号 Ibaraki, (JP)

森原知子(KUWAJARA, Tomoko)[JP/JP]

1505-5044 茨城県つくば市並木2丁目1番3号 AIUZ Ibaraki, (JP)

**(54)Title: NUCLEIC ACID ENZYME SHOWING ALLOSTERIC RNA-CLEAVING ACTIVITY ON TARGET RNA**

(54)発明の名称  
標的RNAに対してアロスデリックなRNA切断活性を示す核酸酵素



**(57) Abstract**

A nucleic acid enzyme showing an allosteric RNA-cleaving activity on a target RNA; an expression vector containing a DNA encoding this nucleic acid enzyme; a process for producing the above nucleic acid enzyme characterized by effecting transcription onto RNA with the use as a template of the above expression vector containing the DNA encoding the nucleic acid enzyme; medicinal compositions containing as the active ingredient the above nucleic acid enzyme or the expression vector containing the DNA encoding the nucleic acid enzyme; and a method of specifically cleaving the target RNA by using the nucleic acid enzyme.

## 明 細 書

標的RNAに対してアロステリックなRNA切断活性を示す核酸酵素

## 技術分野

本発明は、核酸酵素およびその利用に関し、より詳細には、標的RNAに対してアロステリックなRNA切断活性を示す核酸酵素およびその利用に関する。

## 背景技術

1980年初頭、米国コロラド大学のCechらによるテトラヒメナのrRNAのセルフスプライミング現象の発見 (K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaig, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, Cell, 31, 147-157(1982)) と、米国エール大学のAltmanが行ったRNAとタンパク質の複合体酵素であるリボヌクレアーゼPの解析結果 (C. Guerrier-Takada, K. Gaydiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, Cell, 35, 849-857(1983)) から、触媒機能を有するRNAであるリボザイム(ribozyme: ribonucleotide acid+enzyme) が見いだされた。以降、様々なリボザイムが発見され (R. H. Symons, *Trend. Biochem. Sci.*, 14, 445-450(1989) ; R. H. Symons, *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 641-671(1992) ; J. Bratty, P. Chartrand, G. Ferbeyre, R. Cedergren, *Biochim. Biophys. Acta*, 1216, 345-359(1993) ; Hasehoff, J. and W. L. Gerlach, *Nature*, 334, 585-591(1988) ; C. J. Hutchins, P. D. Rathjen, A. C. Forster, R. H. Symons, *Nucleic Acids. Res.*, 14, 3627-3640(1986))、逆転写酵素、イントロンの発見、RNA editing などとあわせて、不動のセントラルドグマの概念をゆるがしたのである。同時に、それまでDNAとタンパク質の間で情報の仲介屋程度にしか認識されていなかったRNAが、(遺伝) 情報と(触媒) 機能の二役を兼ね備えていることから、RNA分子こそが生命の起源とする“RNAワールド”説の中心的分子として注目されるようになった (G. F. Joyce, *Nature*, 338, 217-224(1989) ; N. R. Pace, T. L. Marsh, *Origins of Life*, 16, 97(1985) ; A. Lazcano, R. Guerrero, J. Oro, *J. Mol. Evol.*, 27, 283(1988) ; L. E. Orgel, *Nature*, 358, 203(1992) ; R. F. Gesteland, J. F. Atkins,

The RNA World, Monograph 24, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plain view, New York(1993))。

なかでもハンマーヘッド型リボザイムは、これまで最も長く研究がなされてきたリボザイムの一つである。これは、天然においては自己切断反応(シス型)として機能するリボザイムであるが (T. R. Cech, *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 543(1990) ; A. C. Foster, R. H. Symons, *Cell*, 49, 211(1987) ; A. C. Jeffries, R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.*, 17, 1371(1989))、UhlenbeckらとHaseloffとGerlachらのグループによって2本のRNA鎖(基質領域と酵素活性保持領域)に分割(トランス化)されたことから (O. C. Uhlenbeck, *Nature*, 328, 596(1987) ; J. Hasehoff, W. L. Gerlach, *Nature*, 334, 585(1988))、リボザイムによる遺伝子治療への応用の可能性が示唆された。以降、癌やエイズなどを標的とした様々な応用研究が、数多く報告されている (M. Cotten, M. L. Bimstiel, *EMBO J.*, 8, 861(1989) ; N. Sarver, E. Cantin, O. Chang, O. Lande, D. Stephens, J. Zaia, J. Rossi, *Science*, 247, 1222(1990) ; M. Homann, M. Tzortzakari, K. Rittner, S. Sezaki, M. Tabler, *Nucleic Acids Res.*, 21, 2809(1993) ; R. C. Mulligan, *Science*, 260, 926(1993) ; S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10898(1993) ; P. Marschall, J. B. Thompson, F. Eckstein, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 14, 523(1994) ; S. M. Sullivan, *J. Invest. Dermatol.*, 103, 85(1994) ; F. H. Cameron, P. A. Jennings, *Antisense Res. Dev.*, 4, 87(1994) ; L. Q. Sun, D. Warrilow, L. Wang, C. Witherington, J. Macpherson, G. Symonds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9715(1994) ; R. E. Christoffersen, J. J. Marr, *J. Med. Chem.*, 38, 2023(1995) ; G. Ferbeyre, J. Bratty, H. Chen, R. Cedergren, *Gene*, 155, 45(1995) ; M. Kientopf, E. L. Eaquivel, M. A. Brach, F. Herrmann, *J. Mol. Med.*, 73, 65(1995) ; J. D. Thompson, D. Macejak, L. Couture, D. T. Stinchcomb, *Nat. Med.*, 1, 277(1995) ; T. Tuschl, J. B. Thomson, F. Eckstein, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 296(1995))。

リボザイムは、基質と相補的な塩基対を形成することによって、基質RNAと結合する。その後、反応に必須となるマグネシウム存在下で、基質RNA分子の切断が起こる。基質の認識は、Stem I と Stem III の双方の基質結合領域がそれに

対応した基質配列と適切な塩基対を形成することによってなされるので、リボザイムの基質特異性は非常に高い、基質特異性が非常に高いと、細胞内に於いてほとんど副作用が起らないため、リボザイムを遺伝子発現阻害剤として用いる場合の大きなメリットとなる。

しかし、このリボザイムの高い基質特異性にも例外がある。それは、ターゲットとなる基質がキメラ（二つ以上の異なる遺伝子配列が結合して一つの遺伝子として機能する）の場合である。本来、ある配列（exon 2）に別の配列（exon 3）がつながるべきところへ、スプライシングのミスなどが起きて別のキメラ配列（exon 1-exon 3）が誤って生じ、癌などの発病を招く場合、リボザイムを用いてこの異常なRNAの発現を抑制するという遺伝子治療が考えられる。それぞれの配列自体（exon 1, exon 2, exon 3）は正常なメッセージであるので、異常型のジャンクション配列（exon 1-exon 3）をもつmRNAのみを特異的に切断し、その発現を抑えることが重要となってくる。つまり、正常なmRNA（exon 2-exon 3）には全く影響を及ぼさないリボザイムを用いなくてはならない。

従来のハンマーヘッド型リボザイムを用いてこのような遺伝子の発現抑制を行うおうとするとする場合、異常型のmRNAに特異的な配列部分である exon 1-exon 3 のジャンクション部位に、リボザイムの切断可能な配列のGUCトリプレット（一般にはNUX（N；A, G, C, U X；A, C, U））がある場合には、問題は生じない。しかし、運良くジャンクション部位またはその近傍に、リボザイムの切断配列があることはまれである。ジャンクション部位に切断可能な配列がない場合、ジャンクション部位から遠く離れた部位にある切断配列をターゲットとすることはできない。しかしジャンクションから遠く離れた切断部位自体の配列は、正常なmRNAにも異常型のmRNAにも存在している。結局、正常型のmRNAへの非特異的な切断が起こってしまうことがどうしても避けられなくなる。また、たとえジャンクション部位またはその近傍にリボザイムの切断配列であるNUX配列があったとしても、それがハンマーヘッド型リボザイムが好んで効率的に切断できる配列のトリプレット（GUCトリプレット）である可能性はさらに低い。従って、このようなケースに於いても、高い切断活性を保ったまま、特異性の非常に高いリボザイムを構築することは困難であった。

実験このようなある特定のキメラ型mRNAが発病の原因になる有名な例として、CML（慢性骨髄性白血病）やALL（急性リンパ性白血病）の原因となるフィラデルフィア染色体の形成がある。これらの白血病では染色体相互転座t(9;22)(q34;q11)が生じてBCR-ABL融合遺伝子が生成する。CMLではK28translocationとL6 translocationの2つのタイプの染色体相互転座により、2つのタイプのBCR-ABL融合遺伝子が生じ、最終的に2種類のキメラmRNAがスプライシングの結果生成する(K28ジャンクション(b3a2)mRNAとL6ジャンクション(b2a2)mRNA)。そのうちのひとつにはBCR-ABLジャンクション部位の近くにハンマーヘッド型リボザイムが切断できる配列（GUUトリプレット）があるが(K28ジャンクション(b3a2)mRNA)、もう一つのタイプのタイプのmRNAにはジャンクション部位の近傍に、有力な切断配列が存在しない(L6ジャンクション(b2a2)mRNA)。そのため、従来のハンマーヘッド型リボザイムでは後者のmRNAからの発現を特異的に阻害することができない。現在までに報告されているL6mRNAからの異常なタンパク質(p210<sup>BCR-ABL</sup>)の発現をリボザイムで阻害する試みは、ハンマーヘッド型リボザイムに長いアンチセンス部分を足し、それをジャンクション部位に相補的に結合させて、切断特異性を獲得しようとしたものがほとんどである。しかし、この長いアンチセンス部分の付加によってリボザイムの基質結合部分が長くなると、いったんリボザイムが基質に結合した後、基質から解離するステップが非常に遅くなる。そのため、酵素としてのターンオーバーができず切断効率が低下してしまう。さらにそうまでして獲得しようとした基質特異性は期待したほど高くない。これは最すぎるアンチセンス部分の配列が、正常型mRNAであるABLmRNAやBCRmRNAへ部分的に結合してしまい、リボザイムの基質認識力を甘くさせてしまうからである。その結果正常型mRNAへの非特異的切断が避けられないといった状況になっている。

従って、本発明は、基質に対してアロステリックな切断活性を示す核酸酵素を提供することを目的とする。

また、本発明は、前記の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターを提供することも目的とする。

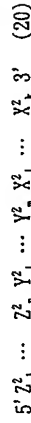
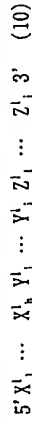
さらに、本発明は、前記の核酸酵素または前記の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物を提供することも目的とする。

する。

さらにまた、本発明は、前記の核酸酵素の製造方法および利用方法を提供することをも目的とする。

#### 発明の開示

本発明者らは、1つの活性中心領域と2つの基質結合領域を待ち、一方の基質結合領域でL6(b2a2)キメラ型mRNAのジャンクション部位に結合し、もう一方の基質結合領域でジャンクション部位から遠く離れた効率の良い切断配列に結合して、その切断配列の後で基質を切断することができる核酸酵素（リボザイム）を構築し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、標的RNAに対してアロステリックなRNA切断活性を示す核酸酵素を提供する。本発明の核酸酵素は、下記のヌクレオチド配列(10)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(20)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有するとよい。



(配列中、 $X_1' \sim X_b'$ 、 $X_1^2 \sim X_k^2$ 、 $Y_1' \sim Y_c'$ 、 $Y_2^2 \sim Y_c^2$ 、 $Z_1' \sim Z_j'$  および  $Z_1^2 \sim Z_a^2$  は、

各々独立に、A、U、T、CまたはGのいずれかであり、

$h$  および  $k$  は1以上の整数（例えば、1～100の整数）であり、

$i$  および  $m$  は1以上の整数（例えば、1～100の整数）であり、

$j$  は1以上の整数（例えば、1～100の整数）であり、

$n$  は1以上の整数（例えば、1～100の整数）であり、

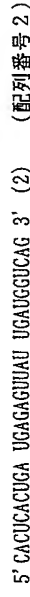
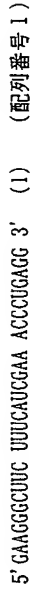
$X_1' \dots X_b'$  および  $X_1^2 \dots X_k^2$  は、標的RNA中の特異的配列に相補的なヌクレオチド配列であり、

$Y_1' \dots Y_c'$  および  $Y_2^2 \dots Y_c^2$  は、ステムを形成するヌクレオチド配列であり、

$Z_1' \dots Z_j'$  および  $Z_1^2 \dots Z_a^2$  は、標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的である領域および標的RNAの存在下でのみ $Mg^{2+}$ イオンを捕捉する空洞を形成しうる領域を含むヌクレオチド配列である。）

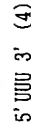
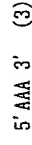
標的RNAとしては、疾病の原因となるキメラ型mRNAが挙げられる。このキメラ型mRNAは慢性骨髄性白血病の原因となるL6 (b2a2) キメラ型mRNAであってもよい。

本発明の核酸酵素は、例えば、下記のヌクレオチド配列(1)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(2)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有するとよい。

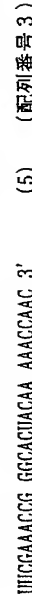


(ただし、ヌクレオチド配列(1)の21番目～29番目のヌクレオチドおよびヌクレオチド配列(2)の17番目～31番目のヌクレオチドは標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的になるように改変されてもよい。)

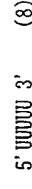
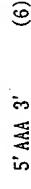
ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの上流にリンカー配列およびtRNA<sup>Val</sup>1プロモーター配列が付加されていてもよい。ヌクレオチド配列(1)の上流に付加されているリンカー配列は下記のヌクレオチド配列(3)を含み、ヌクレオチド配列(2)の上流に付加されているリンカー配列は下記のヌクレオチド配列(4)を含むとよい。



また、ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの上流に付加されているtRNA<sup>Val</sup>1プロモーター配列は下記のヌクレオチド配列(5)を含むとよい。



さらに、ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの下流に付加配列およびターミネーター配列が付加されていてもよい。ヌクレオチド配列(1)の下流に付加されている付加配列は下記のヌクレオチド配列(6)を含み、ヌクレオチド配列(2)の下流に付加されている付加配列は下記のヌクレオチド配列(7)を含み、ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの下流に付加されているターミネーター配列は下記のヌクレオチド配列(8)を含むとよい。



標的RNAは疾病の原因となる異常型mRNAであってもよい。この異常型mRNAとし

ては、H I V（エイズ）、急性リンパ性白血病、急性前骨髄球性白血病などの原因となる異常型mRNAを挙げることができる。

また、本発明は、前記の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターを提供する。

さらに、本発明は、前記の核酸酵素の製造方法であって、該核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクター-DNAを鋳型として、RNAに転写することを特徴とする、前記の方法を提供する。

さらにまた、本発明は、前記の核酸酵素または該核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物も提供する。この医薬組成物は、標的RNAが原因となって生じる疾病を予防および/または治療するためのものであるとよい。標的RNAが原因となつて生じる疾病としては、フィラデルフィア染色体異常により生じる疾病、例えば、慢性骨髄性白血病が挙げられる。本発明の医薬組成物は、例えば、前記の核酸酵素を生体内で発現させて、疾病の原因となるキメラ型mRNAや異常型mRNAの発現の抑制または阻害するために用いることができる。

さらに、本発明は、前記の核酸酵素を用いて、標的RNAを特異的に切断する方法を提供する。標的RNAは、疾病の原因となるキメラ型mRNAであってもよい。疾病としては、フィラデルフィア染色体異常により生じる疾病、例えば、慢性骨髄性白血病が挙げられる。あるいはまた、標的RNAは疾病の原因となる異常型mRNAであってもよい。このような疾病としては、H I V（エイズ）、急性リンパ性白血病、急性前骨髄球性白血病などを挙げることができる。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. ダイマー型ミニザイムの構築

まずハンマーヘッド型ポリボザイム、ミニザイム、および本明細書で紹介する非常に高活性なミニザイムであるダイマー型ミニザイムについて、設計と構築過程について述べる。

1-1 ハンマーヘッド型ポリボザイム    ー 金属酵素－

ミニザイムの話をする前に、まずハンマーヘッド型ポリボザイムについて簡単に説明する。

ハンマーヘッド型ポリボザイムとは、そのRNAの二次構造の形状がカナヅチの頭（ハンマーヘッド）に似ているところから命名された（Hasehoff, J and W. L. Gerlach, Nature, 334, 585-591(1988) ; C. J. Hutchins, P. D. Rathjen, A. C. Forster, R. H. Symons, Nucleic Acids. Res., 14, 3627-3640(1986)）。基礎及び応用の両分野にわたって幅広い研究がなされており、RNA鎖切断活性を持つポリボザイムのうちで代表的なものである。植物に感染するウイルスのウィロイド（現在までに知られている最も小さな病原体、タンパク質の殻を持たない一本鎖の環状RNA）や、ウィルソイド（RNAウイルスの中に存在している、単独では感染性のない一本鎖の環状RNA）、またウィロイドの助けを借りることで植物に感染するサテライトRNAなどにおいて、その複製過程から自己切断を起こすRNAが見つかった。活性に必要な部分だけをin vitroで再構築した結果、高い相同性のある二次構造、即ちハンマーヘッド構造が見いだされたのである（Hasehoff, J and W. L. Gerlach, Nature, 334, 585-591(1988) ; C. J. Hutchins, P. D. Rathjen, A. C. Forster, R. H. Symons, Nucleic Acids. Res., 14, 3627-3640(1986) ; T. R. Cech, Annu. Rev. Biochem., 59, 543(1990) ; A. C. Foster, R. H. Symons, Cell, 49, 211(1987) ; A. C. Jeffries, R. H. Symons, Nucleic Acids Res., 17, 1371(1989) ; A. C. Foster, R. H. Symons, Cell, 50, 9(1987)）。その後、種々のハンマーヘッド型ポリボザイム間で保存されている塩基配列が明らかになり、比較的保存されている酵素活性領域と、そうでない基質領域とに、先程も述べたようなトランス化が行われた（図1）（O. C. Uhlenbeck, Nature, 328, 596(1987) ; J. Hasehoff, W. L. Gerlach, Nature, 334, 585(1988)）。これより、ハンマーヘッド型ポリボザイムは、基質RNAを認識して結合するアンチセンス領域、そのすぐ近傍にあるループ（穴）から成る活性中心領域、ループに付随するstem-loop II 領域から形成される。さらに基質RNA上の切断可能配列として、三つの塩基配列の組（トリプレット）の法則性が明らかにされ、NUXという配列の後でのみ切断が起こることが分かった（M. Koizumi, S. Iwai, E. Ohtsuka, FEBS Lett., 228(1988) ; D. E. Ruffer, G. D. Stormo, O. C. Uhlenbeck, Biochemistry, 29, 10695(1990) ; C. C. Sheldon, R. H. Symons, Nucleic Acids Res., 17, 5679(1989) ; R. Perriman, A. Delver, W. L. Gerlach, Gene, 113, 157(1992) ; T. Shimaya

ma, S. Nishikawa, K. Taira, *Biochemistry*, 34, 3649(1995) ; M. Zoumadakis, M. Tabler, *Nucleic Acids Res.*, 23, 1192(1995) )。このNUXルールのなかで、最も切断効率の高いトリブレットがGUCという配列であり、通常このGUCがリボザイムの切断配列として説明されることが多い、このトリブレット以外で、基質と相補的に結合するアンチセンス領域の配列は、基質の塩基配列あわせて自由に設定できる。つまりリボザイムはその設計次第で、あらゆるRNA配列を部位特異的に切断できる。そのため、特定の遺伝子の発現阻害剤として、その遺伝子治療などへの応用が可能となったのである。いわばリボザイムは、“狙ったRNA鎖”を自由に切断できる“分子はさみ”だといえる。

ここで重要なことは、これまで述べてきたハンマーヘッド型リボザイムのRNA鎖切断活性には、マグネシウムイオンなどの2価陽イオンが必要なことである。このマグネシウムイオンは、リボザイムが活性型の構造を形成するためにも必要になるのだが、その詳細な反応機構への関与は十分には分かっていない。しかし、これまでの実験結果から、実際にRNA鎖の切断を行っているのはマグネシウムイオンで、リボザイムは単に金属イオンの足場を提供しているにすぎないことが明らかとなっている (S.C. Dahm, W.B. Derrick, O.C. Uhlenbeck, *Biochemistry* 32, 13040(1993) ; J.A. Piccirilli, J.S. Vyle, *Nature* 361, 85(1993) ; Michael. Yarus, *FASEB J*, 7, 31(1993) ; T. Uchimaru, M. Uebayasi, K. Tanabe, K. Taira, *FASEB J*, 7, 137(1993) ; T.A. Sreitz, J.A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6498(1993) ; M.A. Pyle, *Science* 261, 709(1993) ; T. Uebayasi, T. Uchimaru, T. Koguma, T. Sawata, S. Shimayama, K. Taira, *J. Org. Chem.*, 59, 7414(1994) ; S. Sawata, M. Komiya, K. Taira, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2357(1995) ; P. K. R. Kumar, D. M. Zhou, K. Taira, *Nucleic Acids and Molecular Biology* 10, 217, (1996) )。つまり、リボザイムは金属酵素なのである。実際にその足場を提供していると考えられる領域は、先程述べたハンマーヘッド型リボザイムを形成する幾つかの領域のうち、切断部位の近傍のループ部分であり、この金属イオンをとらえるループ以外の領域は、様々な変化が可能である。例えば、基質結合領域をRNAより安定なDNAに置き換えることも可能であるし、次に述べるようにstem-loop!!領域を削って小型化することも可能となってくる (J. Goodchild, V.

Kohli, *Arch. Biochem. Biophys.*, 284, 386(1991) ; M.J. McCall, P. Hendry, P. A. Jennings, *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5710(1992) ; J.B. Thompson, T. Tuschl, F. Ekstein, *Nucleic Acids Res.*, 21, 5600 (1993) ; D. Fu, F. Bensele, L.W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4591(1994) ; D.M. Long, O.C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6977(1994) )。

1-2 ミニザイム

ダイマー型ミニザイムの構築過程を図2に示す。この図を参照しながらミニザイムおよびダイマー型ミニザイムの構築過程について説明する。

ミニザイムとは前述したように、小型化したハンマーヘッド型リボザイムである。この小型化は通常、アンチセンス領域 (stem I および stem II)、活性中心領域、stem-loop!! 領域からなるハンマーヘッド型リボザイムのstem-loop!! 領域を短鎖のリンカーで置き換えることによって構築されてきた。初期の試みとして、stem-loop!! 領域の削除が行われた。これは、ハンマーヘッド型リボザイムのそれぞれの領域が、切断活性にどのような役割をはたしているのかを調べるために行われた。この結果、完全にstem-loop!! 領域を削除してしまうと、切断活性は著しく低下することが明らかになった。以降、切断活性を保持しつつ、小型化したりリボザイムを構築するために、stem-loop!! 領域をさまざまな長さのヌクレオチドで代替する模索が行われた。例えば、stem-loop!! 領域を全て削ってしまわずに、この部分を4残基のヌクレオチド (テトラループ) で置換することによって、ミニザイムを構築する試みなどである。しかし結局、近年報告されている詳細な解析から、stem-loop!! 領域の核酸塩基の数を減少させると、その切断活性に著しい影響を及ぼすことが明らかとなった。実際に、今まで報告されてきた数々のミニザイムは、その切断活性が野生型ハンマーヘッド型リボザイムの100分の1以下で、1000分の1以下のものも少なくない (J. Goodchild, V. Kohli, *Arch. Biochem. Biophys.*, 284, 386(1991) ; M.J. McCall, P. Hendry, P. A. Jennings, *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5710(1992) ; J.B. Thompson, T. Tuschl, F. Ekstein, *Nucleic Acids Res.*, 21, 5600 (1993) ; D. Fu, F. Bensele, L.W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4591(1994) ; D.M. Long, O.C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6977(1994) )。stem-loop!! 領域の削除また

は減少は、リボザイムが切断反応を行う上で必要となる活性型の構造をこわしてしまふことにつながると考えられている。これより、ミニザイムは従来のハンマーヘッド型リボザイムに比べて、抗ウイルス剤や遺伝子治療への応用に実用的ではないと考えられた。そして、この分野の多くの研究者達の興味をそれほど引くものではなくなっていた。

#### 1-3 ダイマー型ミニザイムの構築 一高活性なミニザイム

さて、1-2 で述べたようなミニザイムの構築を本発明者らも行ったところ、幸いにも非常に高活性（野生型の60%以上 ( $k_{cat} = 2.5 \text{ min}^{-1}$ : 1分子のリボザイムが1分間に、2.5分子の基質を切断することを意味する)) ものが得られた

(S.V. Amontov, K. Taira, J. Am. Chem. Soc., 118, 1624(1996))。このミニザイムの高活性の理由として、濃度変化の実験過程においてある示唆が得られた。

それは高濃度領域では全く違った機構で働くこと、つまりダイマー（ホモダイマー；同じ配列を持つ同一分子が、2つ結合してダイマーを形成する）として機能することが塩基の配列上考えられたのである。そこで、ダイマーとして作用するのかどうかを調べるために、ダイマー構造をとらない限り、活性が得られないようなヘテロダイマー型ミニザイムをデザインした（図2の下段）。このヘテロダイマー型ミニザイムは、それぞれ違う配列を持ったヘテロ分子であるMzL（ミニザイム・Left）とMzR（ミニザイム・Right）が結合してダイマーを形成する。しかしダイマー型構造をとらずに、従来のハンマーヘッド型リボザイムのように1分子で基質と結合しようとする、片方の基質結合領域の配列（アンチセンス領域にある基質と相補的に結合するstem Iまたはstem IIIのどちらか）しか、基質と塩基対を形成できないように設計されているため、正しく結合できず切断反応は起こらないようになっている。

実際に切断実験を行ってみたところ、明らかな切断活性が観測された。そして、これまで著しく高活性を示したミニザイムは、ダイマーとして機能していたことが明らかとなった（S.V. Amontov, K. Taira, J. Am. Chem. Soc., 118, 1624(1996)）。この新しく構築されたダイマー型ミニザイムは、ハンマーヘッド型リボザイムと同様、マグネシウムイオンを必要とし、ダイマーを形成するstem I部分のG-C塩基対が重要となる（S.V. Amontov, K. Taira, J. Am. Chem. Soc., 118,

1624(1996) ; S.V. Amontov, S. Nishikawa, K. Taira, FEBS Lett., 386, 99(1996)。

#### 2. 基質RNA分子を同時に2カ所で切断するダイマー型ミニザイムの構築

ここではこのダイマー型ミニザイム特性を生かした、まったく新しいタイプのリボザイムである“一つの基質を同時に2箇所で切断するダイマー型ミニザイム”の構築過程について述べる（T. Kuwabara, S.V. Amontov, M. Warashina, J. Okawa, K. Taira, Nucleic Acids Res., 24, 2302(1996)）。

##### 2-1 基質RNA分子を同時に2カ所で切断するリボザイムのメリット

以上のようにして構築されたダイマー型ミニザイムは、図3に示すようにそれぞれ違う配列を持ったヘテロ分子であるMzLとMzRが結合してダイマーを形成する。この図の点線より上側と下側に分けて眺めてみていただきたい。金属酵素であるリボザイムにとつて、切断活性に必要なマグネシウムイオンをとらえる足場となる活性中心領域、そして、基質RNA配列のどこを切るかを決める基質結合領域が、双方に独立して一つずつあることに気付く。すると、このダイマー型ミニザイムは1つの基質に同時に2カ所へ結合し、その2箇所のNUXXトリプレットの後で基質を切断できるのではないかと考えられた。

この構築のメリットは、一つは当然のことながら、切断部位が1箇所しかない従来のリボザイムに比べて、基質の切断効率が高くなることである。しかしそれ以外にも一つメリットがある。それは、ダイマー型ミニザイムの一方の基質結合領域が、基質と非常に結合しやすい（すなわち、基質とリボザイムの結合の $k$ 値が十分に低い）配列に設定できれば、他方はリボザイムの切断部位がGUC以外で、たとえば高い $k_d$ 値を示しても（すなわち、基質とくつきにくい、不安定な配列であつても）、 $k_{cat}$ 値の高いトリプレットを選択する限り効率よく2箇所を切断できる可能性を持つ。つまり、片方の基質結合領域がいったん基質に結合してしまえば、他方の基質結合領域と基質との結合は、いってみれば同一分子内の反応になる。従つて、その衝突確率は分子間のものよりも著しく増大することになるからである。

##### 2-2 BCR-ABL キメラmRNAを特異的に切断するダイマー型ミニザイム

ダイマー型ミニザイムは、そのダイマー構造ゆえに活性中心領域と基質結合領

域を2つずつ持っている。そこで、一方の基質結合領域で異常なBCR-ABL chimeric mRNA のジャンクション部位に結合し、もう一方の基質結合領域で、ジャンクションから遠く離れた箇所にある、最も効率のよい切断配列に結合し、その(GUC)トリプレットの後で基質を切断するというシステムの構築が可能である(図4)。いわば、片方の基質結合領域は異常型の基質を認識する“目”として働き、もう片方の基質結合領域が基質を切断するリボザイムの働きの“実”を担う腕として機能するわけである。

この構築で重要なことは、ダイマー型ミニニザイムの一方の基質結合領域が異常なBCR-ABL キメラmRNAのジャンクション部位に結合したときに初めて、リボザイムとして活性を発現できる安定なダイマー構造を形成する点にある。このダイマーの安定性を左右するのが、stemII部分の塩基対の形成にある。この塩基対の安定性が高過ぎると、ダイマー型ミニニザイムは(基質がなくても)それ自体でダイマー構造を形成してしまう。その結果、ダイマー型ミニニザイムの基質を切断する側の基質結合領域が、“目”として基質を認識するもう片方の基質結合領域が機能する、しないにかかわらず、対象となる基質領域に結合してしまう。そうすると、切断する部分の配列は正常型mRNAであるABLmRNA やBCRmRNA 上にもあるので、結局従来のハンマーヘッド型リボザイムで問題となっていた非特異的な切断が生じることに変わりはなくなってしまう。そうかといってstemII部分の塩基対の安定性が低過ぎると、活性型のダイマー構造が形成しにくくなり、基質切断効率の非常に低い、従来のミニニザイムと同様の問題点が生じてくる。この双方の問題を克服できるような、微妙なstemII部分の塩基対の安定性の獲得と異常mRNA存在下でのみ活性型リボザイムを形成するような塩基配列の工夫が、このシステムの構築の鍵を握っているのである。

またさらに、このシステムの構築の場合、異常型のmRNAを認識して特異的に結合する側は、基質を切断するわけではない。そこでRNA鎖切断に必要な、金属イオンを捕らえる足場を提供する活性中心領域の配列を割ることができ、よって、これまでのダイマー型ミニニザイムをさらに小型化することができ(図4の右)。この、さらに小型化したダイマー型ミニニザイムを極めて活性の低い単量体形態の従来のミニニザイムと区別するため、我々はマキシザイム “maxizyme”と名

付けた。“maxizyme”は、minimized (最小化された)、active (活性な)、x-shaped (xの形をした、ヘテロ二量体形の) としてintelligent (インテリジェントな、アロステリックに制御可能な) ribozyme (リボザイム) を意味する。実際にBCR-ABL キメラmRNAを特異的に切断するようにデザインしたマキシザイムを図5に示す。この図を見てわかるように、活性型ダイマー構造は、ターゲットとするBCR-ABL キメラmRNAと、ダイマー型ミニニザイムの2カ所の基質結合領域が正しく結合したときのみに形成される(図5の中段に表示)。ターゲットとしない正常型ABLmRNA の存在下では、不活性型の構造しかできないように設計されている。ジャンクションを認識する側の基質結合領域に正常型ABLmRNA 配列がやってきた場合、不活性型構造をとる(図5の下端の上側に示した構造)。ハンマーヘッド型リボザイムの切断活性にとって必須なマグネシウムイオンを捕らえる活性中心部位の構造が、活性型ダイマー構造に図示したものと違っていて、崩れているのがわかんと思う。この結果、このダイマー型ミニニザイムによる正常型ABLmRNA への、非特異的切断は起こらない。また、基質を切断する側の基質結合領域が、単独で基質と結合したとしても(※この場合、結合する基質としては正常型ABLmRNA A とBCR-ABL キメラmRNAの双方が考えられる。)、もう一方の基質結合領域に標的的BCR-ABL キメラmRNAの配列がない限り、図に示したような活性部位が閉じた構造を形成する(図5の下端の下側に示した構造)。この結果、切断に必須となるマグネシウムイオンを捕らえないので、切断は起こらない。

BCR-ABL融合mRNAの翻訳産物は慢性骨髄性白血病(CML)を引き起こす。これはフィラデルフィア染色体陽性を伴う、造血幹細胞のクローン性(clonal)骨髄増殖疾患である(NowellおよびHungerford, 1960)。染色体の相互転座 t(9; 22)(q34; q11)は、K28 転座およびL6 転座の2種類に分けられ、それらはBCR-ABL融合遺伝子の形成をもたらす。これらの遺伝子は2種類のmRNAをコードする。すなわち、b3a2 (BCRエキソン3およびABLエキソン2からなる) およびb2a2 (BCRエキソン2およびABLエキソン2からなる) である(図9; Rowley, 1973; Bart ramら, 1983; Heisterkampら, 1983; Groffenら, 1984; Shtivelmanら, 1985, 1986)。これらのmRNAは両方とも210 kDa のタンパク質 (p210<sup>BCR-ABL</sup>) に翻訳される。これは上記悪性細胞の表現型に独特のものである(Konopkaら, 1984)。



キメラRNAを破壊することができリボザイムを設計するためには、ジャンクション配列を標的にする必要がある。そうしなければ、該キメラRNAの一部を共有する正常なRNAもリボザイムによって切断されてしまい、宿主細胞に害を与えることになる(図9、下段のパネル)。K28 BCR-ABLキメラRNA配列 b3 a2の場合は、リボザイムによる潜在的な切断部位であるGUUトリプレットがキメラジャンクションから3ヌクレオチド上流に位置している。したがって、従来の方法で設計されたハンマーヘッド型リボザイムは、K28 転座から生じた異常なmRNAを特異的に切断すると予想されうであろう。実際、そのような切断のいくつかの例が報告されている(Shoreら, 1993; Snyderら, 1993; Langeら, 1993, 1994; Wrightら, 1993; Kearneyら, 1995; Leopoldら, 1995; Kronenwetterら, 1996)。対照的に、L6転座および幾つかのK28 転座から生じるb2a2配列の場合は、問題のジャンクションから2〜3ヌクレオチド以内の所にはハンマーヘッド型リボザイムが切断可能なトリプレット配列は存在しない。一般的には、GUUトリプレットがハンマーヘッド型リボザイムによる切断を最も受けやすく、該ジャンクションから45ヌクレオチド離れた所にこのトリプレットが1つ存在している。もしこのGUUトリプレットがリボザイムによって切断されるならば(wt R z; 図10)、異常型BCR-ABL mRNAの配列の一部を共有する正常型ABL mRNAもまた該リボザイムによって切断され、宿主細胞に害を与えるであろう。b2 a2 mRNAを切断しうるリボザイムを設計するにあたって、我々は正常型ABL mRNAの切断を確実に回避しなければならない。

L6 BCR-ABL (b2a2) mRNAの切断をめざした以前の試みは、長いアンチセンスアームとリボザイム配列の組合せを必要とした(Pachukら, 1994; Jamesら, 1996)。ジャンクション領域に結合し、切断部位を越えて若干の距離だけそこを覆う潜在的能力を有する約10〜30ヌクレオチドのアンチセンス配列がハンマーヘッド型リボザイムの基質結合部位の一方に連結された。アニーリングアームの長さはリボザイムの活性にとって重要である。なぜなら、その最さは切断反応の効率および特異性の両方に影響するからである。我々は、上記のアンチセンス付加型リボザイムがin vitroにおいて正常型ABL mRNAを非特異的に切断すること(Kuwabaraら, 1997)を示した。それは、長さ3ヌクレオチド程の小さな結合アーム

さえあればハンマーヘッド型リボザイムが切断能を有するためである(Hertelら, 1996; Birikhら, 1997)。そこで我々は、L6 BCR-ABL (b2a2) mRNAのジャンクション配列が存在する場合にのみ触媒的にコンピテントな構造を形成する新規なマキシザイムを設計できないだろうかと考えたのである。

本発明のマキシザイムは、DNA/RNA 合成機(モデル394; Applied Biosystems, Division of Perkin Elmer Co. (ABI), Foster City, CA) で化学合成したRNAを、脱保護、脱塩、PAGEによる精製を行うことにより、製造することができる。このマキシザイムの切断活性および基質特異性は、以下のようにして評価することができる。異常型BCR-ABL mRNA (120mer)、正常型ABL mRNA (92mer)の2つの基質RNAをラジオアイソトープ(<sup>32</sup>P)で標識したものを用意する。これとマキシザイム、マグネシウムイオンをTris-HCl (pH 8.0) 緩衝液中に混合させ、37°Cで反応させる。反応後、その反応液をPAGEにより分離し、切断の有無をBAS2000イメージアナライザーで検出し、ABL mRNAは切らずにBCR-ABL mRNAを特異的に切断していることの評価を行う。

後述の実施例1および3に記載のように、実際にこのマキシザイムを合成して、基質特異性の評価を行ったところ、正常型mRNAへの非特異的切断はin vitroにおいて全く起こらなかった。またその切断効率の評価は、BCR-ABL キメラmRNAをターゲットとした、現在までに報告されているアンチセンス付加タイプのハンマーヘッド型リボザイムや、他のミニザイムと比べても高かった。

### 3. ダイマー型ミニザイムの遺伝子治療への応用

次に、得られたマキシザイムの、遺伝子治療への応用に向けた利用法の確立およびin vivo での評価について説明する。

生体内でリボザイムを発現させる場合、外部から合成リボザイムをカチオン性の脂質膜などで包んで導入する方法(Malone, RW, Feigner, PL., Verma, IM (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86, 6077)と、ベクターDNA (ウィルスベクターなどを用いて)として導入して細胞内で発現させる方法(Friedmann, T., Roblin, R. (1972) Science 175, 949)の2種類がある。後者の方法を用いるにあたっては使用するプロモーターや転写物の安定性を考慮する必要がある。ダイマー型ミニザイムについて検討することとした。

本発明のリボザイムをコードするDNAを含む発現ベクターは、RNA ポリメラーゼIII のプロモーター、ターミネーター配列及びマキシザイムの配列を連結したものの(tRNA<sup>val</sup>-MzL, tRNA<sup>val</sup>-MzR)をpUC19 (Takara), pGREEN LANTERN (ライフテックオリエンタル株式会社製)、pHaNDR (HUMAN GENE THERAPY 6:905-915 (July 1995)) などのベクターに組み込むことにより、作製することができる。

上記のようにして作製した発現ベクターは、以下のようにして細胞内へ導入することができる。

#### ①リポフェクション(Lipofection) 法

細胞の表面は負に荷電している。そこで、目的のベクター(DNA 2本鎖環状プラスミド)とカチオン性の脂質(リポフェクション試薬(リポフェクションなど))とで複合体をつくり、それを細胞内へ導入する。

#### ②ウイルスベクター法

①に比べ効率が低い。ウイルスの遺伝情報のうち遺伝子発現に必要な部分のみを残し、そこへ治療効果をもつ配列(tRNA<sup>val</sup>-MzL, tRNA<sup>val</sup>-MzR のDNA 配列)を組み込んだものを用意する。このベクターをウイルスの力によって目的細胞のDNAに組み込む。

ベクター配列中のマキシザイムには、RNA ポリメラーゼIII のプロモーター配列が付加されている(tRNA<sup>val</sup>-MzL, tRNA<sup>val</sup>-MzR のDNA 配列)。細胞内に導入されたベクターDNA から、元来細胞内で機能しているRNA ポリメラーゼIII の働きにより、治療効果をもつRNA 配列(tRNA<sup>val</sup>-MzL, tRNA<sup>val</sup>-MzR)が転写されることにより、高い発現力でリボザイムが発現される。

細胞内でリボザイムを高発現させるには、プロモーター配列がリボザイム配列の上流に必要となってくる。polIIIの発現系(Geiduschek, EP., Tocchini-Vale 3)を用いる場合、この発現系ではtRNA<sup>val</sup>配列が余分な配列(リボザイム部分以外のプロモーター配列)として付加されてくる。後述の実施例2に記載のように、実際にマキシザイムの発現ベクターを構築したのであるが、このベクターから発現するリボザイム成分は、tRNA<sup>val</sup>配列の下流に短鎖のリンカーを介してマキシザイムの配列がつながっている図6に示したものである。この図を見ると、tRNA

<sup>val</sup>配列がマキシザイムにとって非常に大きな立体障害となり得ることが予想された。マキシザイムは、MzL 配列とMzR 配列(MzL : ミニザイム・レフト、MzR : ミニザイム・ライト。マキシザイムを形成する2つのダイマー成分のうちのそれぞれ一つ(図5の活性型ダイマー構造参照)。図6中アンダーラインで示した領域)がstemII部分で塩基対を形成して、初めてダイマー型構造ができ、切断活性を発現する。その、それぞれのMzL 配列とMzR 配列の前に、その5倍以上の鎖長をもつ余分なtRNA<sup>val</sup>配列が付加されているのだから立体障害のためにダイマーが形成しない可能性があった。

tRNA<sup>val</sup>配列が付加したタイプのマキシザイムと、何も余分な配列のないマキシザイムについて、切断活性および基質特異性の評価をin vitroで行った(実施例3)。基質としてBCR-ABL キメラmRNA (121mer)、また比較として正常型mRNAとしてABLmRNA (97mer)を用意し、50mM Tris-HCl(pH8.0)、25mM MgCl<sub>2</sub>、37°Cで切断反応を行った結果を図7に示す。すると、驚くべきことに、tRNA<sup>val</sup>配列が付加したタイプのマキシザイムにおいても明らかな切断活性が確認できた。また、正常型ABLmRNA への非特異的切断は全く起こらず、BCR-ABL キメラmRNAに対して非常に高い特異性をもっていることも確認できた。なお、それぞれ片方のマキシザイムの形成成分tRNA<sup>val</sup>-MzL とtRNA<sup>val</sup>-MzR だけでは、活性を得るようなダイマー構造は形成できないため基質のBCR-ABL mRNAの切断は起こらなかった。

さらに短い鎖長の基質を用いた詳細な反応速度論的解析から、tRNA<sup>val</sup>配列が付加したタイプのマキシザイムと、何も余分な配列のないマキシザイムの切断効率の比較を行ってみた。その結果を図8に示すが、これより我々は非常に興味深い結果を得た。何んと両者のk<sub>cat</sub>値およびk<sub>d(app)</sub>値がほとんど同じ値になったのである。生体内のRNA分解酵素に対してマキシザイムの安定性を強化するtRNA<sup>val</sup>配列が、全くマキシザイムの切断反応に影響を及ぼさないことがわかったのである。もう一度繰り返し、tRNA<sup>val</sup>配列が付加したタイプのマキシザイムは、何も余分な配列のないマキシザイムと同様の、非常に高い基質特異性を持ち、同等の切断活性も有することが明らかとなった。

また、我々は b2a2 mRNA を特異的に切断することに興味があったので、従

来のハンマーヘッド型リボザイム (w t r z) 、 2 つのアンチセンス付加型ハンマーヘッド型リボザイム (a s R z 52 および a s R z 81 ; Pachukら、 1994 ; Jamesら、 1996) および我々の新規なマキシザイムの培養細胞における特異性および触媒活性を、 L6 BCR-ABL キメラ (b2a2) m R N A の切断について比較した (実施例 10) 。 その結果、 L6 BCR-ABL m R N A のジャンクション配列の存在によって、我々の新規なマキシザイムの活性を *in vitro* のみならず培養細胞においてもアロステリックに制御できることを見いだした (図 12 および 18 ~ 21) 。 マキシザイムの切断活性による p210<sup>BCR-ABL</sup> タンパク質の特異的減少は、不活性なプロカスパーゼ (pr ocaspase)-3 の切断をもたらし、活性なカスパーゼ (caspase)-3 を生じ、その結果 BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞のアポトーシスが起った。同様に、正常細胞ではなく、白血病患者由来の BV173 細胞はマキシザイムに応答してアポトーシスを起こした。対照的に、従来のリボザイムは BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞および H 9 細胞の両方に非特異的にアポトーシスを引き起こした。我々が知るかぎりでは、これは *in vitro* のみならず培養細胞においても完全にアロステリック制御下にある、人為的に作製されたリボザイムの最初の実例である。異常型の m R N A を特異的に認識するセンサームによって活性をアロステリックに制御しうる新規なマキシザイムは、異常なキメラ標的を破壊するための強力な道具であるに相違なく、また CML の治療のための将来の遺伝子療法への基礎を提供するであろう。

リボザイム配列の上流にリンカー配列およびプロモーター配列が、下流にターミネーター配列が付加されていてもよいマキシザイムは、T7 系の酵素を用いて、上記の配列をコードする DNA を鋳型として、RNA に転写させることにより製造することもできる。

tRNA<sup>val</sup>-MzL、tRNA<sup>val</sup>-MzR の DNA 配列の前に T7 RNA ポリメラーゼのプロモーターとなる配列を付加した鋳型 DNA を用意する。この鋳型 DNA と T7 RNA ポリメラーゼ反応液 (Buffer、酵素、NTPs) を混合し、37°C で 2 ~ 4 時間反応を行い、PAGE により精製する。

本発明のマキシザイムを用いて、慢性骨髄性白血病の原因となる L6 (b2a2) キメラ型 mRNA を特異的に切断することができる。その方法の一例を以下に記載する。マキシザイムは 2 つの基質結合領域をもつ。片方で L6 (b2a2) キメラ型 mRNA に特異

的なジャンクション部位に結合し、他方で遠く (45 残基) 離れた部位にある切断可能な GUC トリプレットを、マグネシウムイオン存在下で特異的に切断できる。これにより、正常型 mRNA には何ら影響を与えず、BCR-ABL mRNA から p210<sup>BCR-ABL</sup> が発現することを阻害できる。

本発明のマキシザイムは、医薬、特に、フィラデルフィア染色体異常が生じる疾患を予防および/または治療する医薬として使用することができる。

生体内の RNA ポリメラーゼ (RNA ポリメラーゼ III など) のプロモーター配列を含むマキシザイムの DNA 配列を組み込んだ導入用ベクターを製作する。CML 患者から p210<sup>BCR-ABL</sup> を発現している細胞をとり出し、細胞にベクターを投与、培養する。それを再び生体内へ戻す。

導入用ベクターの代用として、マキシザイム RNA に化学修飾をほどこし、生体内の RNA 分解酵素に対して抵抗性をもたせた RNA を、キャリアー (カチオン性の脂質、リポソームなど) など、細胞内へ導入してもよい。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願特願平 10-60969 号および特願平 10-311098 号の明細書および図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、ハンマーヘッド型リボザイムの二次構造を示す。

図 2 は、ダイマー型ミニザイムの構築過程を示す。

図 3 は、ヘテロダイマー型ミニザイムの二次構造を示す。

図 4 は、BCR-ABL キメラ mRNA をターゲットとしたダイマー型ミニザイムとマキシザイムの構造と作用を示す。図 4 右のマキシザイムの構造において、Y 同志がステムを形成し、X は標的 RNA 中の特異的配列を認識する。

図 5 は、BCR-ABL キメラ mRNA と正常型 ABL mRNA のジャンクション付近の配列及び活性型マキシザイムの二次構造並びに不活性型マキシザイムの二次構造を示す。

図 6 は、tRNA<sup>val</sup> 配列を付加したマキシザイムの二次構造を示す。点線の枠内に示した MzL、MzR 配列のみの場合の二次構造をできるだけ崩さないように tRNA<sup>val</sup> 配列を付加した (アンダーラインで示した部分がマキシザイムの配列)。

図 7 は、BCR-ABL キメラ mRNA をターゲットとする、tRNA<sup>Val</sup> 配列を付加したあるいは付加しないタイプのマキシザイムの切断活性を示す。

図 8 は、BCR-ABL キメラ mRNA をターゲットとする、tRNA<sup>Val</sup> 配列を付加したあるいは付加しないタイプのマキシザイムの速度パラメーターを示す。

図 9 は、BCR-ABL 転座および融合 mRNA を示す。慢性骨髄性白血病を伴う 2 種類の染色体転座 (K28 型 (上段パネル) および L6 型 (下段パネル))、およびそれらに対応する融合 mRNA を示す。白の四角は BCR エキソンを、黒の四角は ABL エキソン 2 を表す。BCR エキソンと ABL エキソンを結ぶ点線は選択的スプライシング経路を示す。L6 転座および幾つかの K28 転座から生じる L6 b2a2 mRNA においては、ハンマーヘッド型リボザイムが切断可能なトリプレット配列は BCR-ABL ジャンクションの近くには存在しない。一般にハンマーヘッド型リボザイムによって最も切断されやすいトリプレットである GUCトリプレットが、ジャンクションから 45ヌクレオチド離れた所に位置している。このようなトリプレットがリボザイムによって切断部位として選択されるならば、異常型 BCR-ABL RNA 配列の一部を共有する正常型 ABL mRNA もまたそのリボザイムによって切断され、宿主細胞に害を与えるであろう (下段パネル)。nts はヌクレオチドを表す。

図 10 は、従来のハンマーヘッド型リボザイムおよびアンチセンス付加型リボザイムのヌクレオチド配列を示す。ジャンクション付近の L6 BCR-ABL mRNA の配列を拡大してある。アンチセンス付加型リボザイム (asR281 および asR252) およびコントロールリボザイム (wtR2) による切断部位を示す。マキシザイムによる切断部位は wtR2 によるそれと同じである。マキシザイムの認識部位を矢印で示す。

図 11 は、活性および不活性なマキシザイムの二次構造を示す。高い基質特異性を達成するためには、マキシザイムは異常型 BCR-ABL ジャンクションの存在下 (上段パネル) でのみ活性なコンホメーションを取らなければならない。他方、正常型 ABL mRNA の存在下または BCR-ABL ジャンクションの不在下 (下段パネル) では、そのコンホメーションは不活性のままではなければならない。MzL および MzR は、異常型 b2a2 mRNA の存在または不在によって、上記のような

コンホメーション変化が起こるのを可能としないなければならない。

図 12 は、in vitro におけるマキシザイム活性のアロステリック制御を示す。tRNA<sup>Val</sup> によって駆動される構成要素を、5' 末端を <sup>32</sup>P で標識した短い 16 量体基質 (S16) と共にアロステリックエフェクター分子 (すなわち、短い 20 量体の正常型 ABL 配列 (ABL20 量体) または短い 28 量体の BCR-ABL 配列 (BCR-ABL 28 量体)) の存在下でインキュベートすることによって、マキシザイム媒介切断の特異性を調べた。MzL および MzR または MzR を 0.1 μM の濃度で、2 nM の 5' 末端を <sup>32</sup>P で標識した基質 (S16) と共にインキュベートした。エフェクター (20 量体 ABL または 28 量体 BCR-ABL) を用いた場合、その濃度は 1 μM であった。

図 13 は、HeLa 細胞における tRNA<sup>Val</sup>-酵素の活性を測定するためのアッセイ系を示す。

図 14 は、キメラ BCR-ABL-ルジフェラーゼ遺伝子および ABL-ルジフェラーゼ遺伝子に対する tRNA<sup>Val</sup>-酵素の効果を示す。同時トランスフェクションした β-ガラクトシダーゼ遺伝子の活性をモニターすることによって測定したトランスフェクション効率を参考にして、ルジフェラーゼ活性を標準化した (実施例 7 の「実験方法」参照)。

図 15 は、BaF3 細胞、およびヒト L6 BCR-ABL mRNA を発現する形質導入された BaF3 細胞の IL-3 への依存を図式的に示す。

図 16 は、MzL 転写物の細胞質への輸送の経過を示す。N は核画分を、C は細胞質画分を表す。

図 17 は、発現された tRNA<sup>Val</sup>-酵素の定常レベルおよびそれらの局在を示す。N は核画分を、C は細胞質画分を表す。

図 18 は、tRNA<sup>Val</sup>-酵素を形質導入した BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞および H9 細胞の生存率の測定結果を示す。tRNA<sup>Val</sup>-酵素を発現する BVI73 細胞の生存率も示した。

図 19 は、tRNA<sup>Val</sup>-酵素を形質導入した BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞および H9 細胞の形態を示す。

図 20 は、BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞中の L6 BCR-ABL mRNA 切断産物のノーザンブロット分析による直接検出の結果を示す。

図2.1は、カスパーゼ-3の32-kDa前駆体（プロカスパーゼ-3）およびカスパーゼ-3そのものを認識する抗体 $\alpha$  CPP32を用いたイムノブロット分析の結果を示す。マキシザイムによるp210<sup>BCR-ABL</sup>タンパク質の特異的枯渇が起こった後、不活性なプロカスパーゼ-3の切断が活性なカスパーゼ-3を生じた。

図2.2は、マキシザイムを導入していない腫瘍細胞を注入したマウス（コントロール；Mz(-)）とマキシザイムを導入した腫瘍細胞を注入したマウス（マキシザイム；Mz(+)）の解剖前の写真である。

図2.3は、マキシザイムを導入していない腫瘍細胞を注入したマウス（コントロール；Mz(-)）とマキシザイムを導入した腫瘍細胞を注入したマウス（マキシザイム；Mz(+)）の脾臓の写真である。

図2.4は、マキシザイムを導入していない腫瘍細胞を注入したマウス（コントロール；Mz(-)）とマキシザイムを導入した腫瘍細胞を注入したマウス（マキシザイム；Mz(+)）の胸腺周辺のリンパ節の写真である。

図2.5は、マキシザイムを導入していない腫瘍細胞を注入したマウス（コントロール；Mz(-)）とマキシザイムを導入した腫瘍細胞を注入したマウス（マキシザイム；Mz(+)）の骨髄の写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例によりさらに具体的に説明する。本発明の範囲は、これらの実施例に限定されることはない。

#### 〔実施例1〕マキシザイムの合成

保護基のついた担体Si基が固定化してあるCPGカラムを用いて、配列番号1および2のマキシザイムの配列に従い、脱トリチル基、カッピング、キヤツピン、酸化を繰り返し、RNAをDNA/RNA合成機（モデル394; Applied Biosystems, Foster City, CA）で化学合成した。合成終了後、カラムよりRNAをNH<sub>4</sub>OH/EtOHで溶出し、脱保護、脱塩処理を行った。最終的に20%変性PAGEにて目的の鎖長のRNAを単離した。

#### 〔実施例2〕tRNA<sup>val</sup>配列が付加したタイプのマキシザイムの製造

tRNA<sup>val</sup>-MzL、tRNA<sup>val</sup>-MzRのDNA配列（図6のtRNA<sup>val</sup>-MzL、tRNA<sup>val</sup>-MzRの配列）

の前にT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列5'-TAATACGACTCACTATA3'（配列番号4）とGGGの配列を付加した、2本鎖のDNAを用意した。

これを鋳型DNAとして、試験管内に、T7 RNAポリメラーゼバッファ、T7 RNAポリメラーゼ、鋳型DNAおよびNTPを入れ、37°Cで2〜4時間転写反応を行った。反応後、5〜8%変性PAGEにより、目的の鎖長のRNAを単離、精製した。

〔実施例3〕tRNA<sup>val</sup>配列が付加したあるいは付加しないタイプのマキシザイムの切断活性および基質特異性の評価(in vitro 試験)

基質となるBCR-ABLのジャンクションを含むBCR-ABL基質、比較として、正常型ABL exon 1-ABL exon 2のジャンクションをもつABL基質を用意した。これらの基質をラジオアイソトープ<sup>32</sup>Pで5'末端標識した。この標識した基質とリボザイムを次のように混ぜ合わせた（試験管内）。

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

25 mM MgCl<sub>2</sub>

1  $\mu$ M マキシザイム

（又はtRNA<sup>val</sup>付加型マキシザイム）

2  $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]標識した基質（BCR-ABL基質またはABL基質）

37°Cで60分間反応させた後、8〜20%変性PAGEで反応生成物（切断され、短い鎖長となったもの）を検出した。マキシザイムはBCR-ABL基質のみを切断するの、ABL基質からは切断生成物は検出されず、BCR-ABL基質を加えたときのみ、切断による生成物が検出された（図7）。

〔実施例4〕tRNA<sup>val</sup>配列が付加したあるいは付加していないタイプのマキシザイムの反応速度論的解析

速度論的解析を容易に行うために、短い鎖長の基質、S16（GUCトリプレットを含むRNA 16mer）とBCR-ABLジャンクション部位近傍の配列を含む20merの擬基質（pseudosubstrate）を用意した。S16は<sup>32</sup>Pで標識し、酵素（マキシザイム）過剰（シングルターンオーバー）、25 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) と混ぜ、切断反応を37°Cで行った。その初速度を観察し、それをEadie-Hofsteeプロットにプロットし、速度定数 $k_{cat}$ 、 $k_{d(app)}$ を検出した。結果を図8に示す。

これより、tRNA<sup>val</sup>配列が付加していないマキシザイムと、tRNA<sup>val</sup>配列が付加

したタイプのマキシザイムのもつ速度パラメーターがほぼ同じであることが分かった。これは、tRNA<sup>val</sup>配列が、活性型ダイマー構造を形成する上で、不利な状況を作りだしていないことを意味し、細胞内での応用に高い期待がもてることが分かった。

#### 〔実施例 5〕 tRNA<sup>val</sup>配列が付加したタイプのマキシザイムの発現

HeLa 細胞（国立感染症研究所より入手）では、リポフェクション法により tRNA<sup>val</sup>-MzL、tRNA<sup>val</sup>-MzR の DNA 配列を組み込んだベクター tRNA<sup>val</sup>-MzL/pUCdt、tRNA<sup>val</sup>-MzR/pUCdt を作成し、それを細胞内へ導入し、ノーザンハイブリダイゼーション実験により、安定に両 tRNA<sup>val</sup>-MzL、tRNA<sup>val</sup>-MzR RNA が高発現していることを確認した。

簡単に説明すると、市販の pUC119 に tRNA<sup>val</sup> をくみこんだプラスミド pUCdt を制限酵素 Csp45I、SalI で切断し、そこへ tRNA<sup>val</sup>-MzL 及び tRNA<sup>val</sup>-MzR の DNA 配列を Cs p45I、SalI で切断した断片を DNA Ligase で連結し、tRNA<sup>val</sup>-MzL/pUCdt 及び tRNA<sup>val</sup>-MzR/pUCdt の両ベクターを作成した。リポフェクション（Gibco-BRL にて販売）を用いて、細胞内へベクターをトランスフェクション（リポフェクション法）し、36 時間培養した細胞から、細胞内で発現している全 RNA を抽出した。この細胞抽出 RNA を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行い、MzL 及び MzR 配列に相補的な配列をもつ DNA をプローブとして、ミニザイムの細胞内での発現を検出した。

〔実施例 6〕ヒト tRNA<sup>val</sup>-プロモーターの制御下にある新規なマキシザイムの具体的設計、および BCR-ABL m RNA のジャンクション配列によるその活性のアロステリック制御の in vitro 実証

CML の治療のための遺伝子療法にマキシザイムを適用するためには、マキシザイムが構成的に、かつ強いプロモーターの制御下で、in vivo において発現されることが重要である。我々は各単量体ユニットを RNA ポリメラーゼ III (Geiduschek および Tocchini-Valentini, 1988; Perriman および de Feyter, 1997) によって認識されるヒト tRNA<sup>val</sup>-プロモーター配列 (Baier ら, 1994; Yu ら, 1995; Kawasaki ら, 1996, 1998; Bertrand ら, 1997) の下流に組み込み、MzL (マキシザイム左) および MzR (マキシザイム右; 図 6) を創出した。ポリメラー

ゼ III プロモーターの制御下における高レベル発現は、マキシザイムを治療剤として用いる場合、明らかに有利であろう。そして、そのような発現は二量体化の可能性をも増大させるであろう。

高い基質特異性を達成するため、我々のマキシザイムは異常型 BCR-ABL ジャンクションの存在下でのみ活性なコンホメーションを取らなければならない (図 1 1、上段のパネル)。他方、そのコンホメーションは正常型 ABL m RNA の存在下および異常型 BCR-ABL ジャンクションの不在下では不活性のままではなければならない (図 1 1、下段のパネル)。図 1 1 に示す具体的に設計された配列 (センサーアームの長さおよび配列、ならびに共通ステム II のそれらが変数であることに留意されたい) は、異常型 b2a2 m RNA の存在または不在に依存する上記のようなコンホメーション変化を可能としなければならない。この現象は、アロステリックなタンパク質性酵素の、エフェクター分子に応答したコンホメーション変化に似ているであろう。我々のマキシザイムの活性および特異性を、同一の切断部位を標的とする従来の野性型リボザイム (wt Rz) および従来のアンチセンス付加型リボザイム (asRz52 および asRz81; 図 1 0) のそれらと比較するため、後者の 2 種類のリボザイムを tRNA<sup>val</sup> 遺伝子の 3' 部分に組み込んだ。

コンホメーション変化が異常型 L6 b2a2 m RNA の存在または不在に依存することを in vitro において証明するため、我々は図 1 1 の上段パネルに大文字で示す標的部位に対応する短い、16ヌクレオチド(nt)からなる BCR-ABL 基質 (S16) を調製した。in vitro で転写されたマキシザイムを、5' 末端を 3' で標識した短い 6 量体基質 (S16) と共に、20 量体正常 ABL エフェクター分子または 28 量体 L6 BCR-ABL エフェクター分子の存在下および不在下でインキュベートすることによって、特異性を試験した。これらのエフェクター分子は、図 1 1 の下段パネル左側の正常型 ABL m RNA および図 1 1 の上段パネルの異常型 L6 b2a2 m RNA に大文字で示す配列にそれぞれ対応していた。

#### 実験方法

##### tRNA を組み込んだ酵素の発現のためのプラスミドの構築

各酵素 (MzL、MzR、wt Rz、asRz52 および asRz81) およびポリメラーゼ III 終止配列 (Geiduschek および Tocchini-Valentini, 1988) をコードする化

学的に合成したオリゴヌクレオチドをPCRによって2本鎖配列に転換した。Cs p 45 IおよびSalIで消化した後、適切な断片をそれぞれpVのtRNA<sup>Val</sup>-プロモーターの下流にクローン化した(pVは、pMX puroベクターのEcoRIおよびSalI部位の間にヒトtRNA<sup>Val</sup>遺伝子の化学的に合成したプロモーターを含んでいた; Kitamuraら, 1995)。構築物の配列は直接配列決定によって確認した。

#### マキシザイムおよびリボザイムの活性のin vitroアッセイ

マキシザイムおよびリボザイムの活性のアッセイは、25 mM MgCl<sub>2</sub>および50 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて、酵素飽和(1代謝回転)条件下で35°Cで60分間のインキュベーションを行なって実施した(図12)。T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造、京都、日本)により基質を[γ-<sup>32</sup>P]-ATPで標識した。各酵素を1 μMの濃度で、2 mMの5'末端を<sup>32</sup>Pで標識したS16と共にインキュベートした(「結果」参照)。各酵素および基質を含む緩衝化溶液にMgCl<sub>2</sub>を加えることにより反応を開始させ、次に得られた各反応混合物を37°Cでインキュベートした。最後に、反応混合物を8%ポリアクリルアミド/7 M尿素ゲルを用いた電気泳動にかけた。

#### 結果

b2a2 mRNAのジャンクション配列に対応する28量体16 BCR-ABLエフェクター分子は、トランスに作用した。この分子はMzLおよびMzRというセンサーアームによって認識されてアニーリングされるに違いなく、そして活性な二量体の形成を引き出すのに役立つに違いない。マキシザイムの他の認識アームは短い16量体BCR-ABL基質RNAにおける切断トリプレットを認識し、そして特異的切断が起こった(図12、右側)。BCR-ABLジャンクションの不在下、または正常型ABL配列(エフェクター分子)の存在下では、基質の切断産物は全く検出されなかった。このことは、予想されたマキシザイムの高い基質特異性を示すものである。

エフェクター分子の存在下および不在下において、MzLまたはMzRは単独では何ら切断活性をもたなかった。活性種は明らかに図12の下段右側に示す二量体形のマキシザイムであり、これが4分子相互作用に関与したのである。原則として、従来のリボザイムによる2分子相互作用は、4分子相互作用よりも

有利なはずである。それにもかかわらず、マキシザイムの切断活性はハンマーヘッド型リボザイムのそれにほぼ等しかった(wt Rz; データは記載していない)。培養細胞中でマキシザイムの活性が従来のハンマーヘッド型リボザイムのそれよりも大きいことも、以下の文節に示すように実証された。エフェクター配列を図11に示すように切断配列に連結した場合にも、同様の結果が得られ、マキシザイムは3分子相互作用に関与した(データは記載していない)。図12に示す結果は以下のことを証明している。すなわち、マキシザイムはトランスに付加されたエフェクター分子(BCR-ABLジャンクション配列)に応答して起こるに相違ないコンホメーション変化(図11に示す)にしたがって完全なアロステリック制御をin vitroにおいて受けた。さらに、上記の結果により、tRNA<sup>Val</sup>部位はアロステリック制御を妨げないことが確認された。

#### (実施例7) 哺乳動物細胞におけるマキシザイムおよび従来のハンマーヘッド型リボザイムの細胞内活性の比較

次に、我々はレポーター構築物を用いて哺乳動物細胞におけるマキシザイムの作用を検討した。マキシザイムの細胞内活性を評価するため、我々はヒトtRNA<sup>Val</sup>-プロモーターの制御下にある適切な酵素ユニットをコードする発現プラスミド、ならびに標的キメラBCR-ABL(またはABL単独)配列およびリシフェラーゼ遺伝子をコードする標的遺伝子発現プラスミド pB2A2-luc(または pABL-luc)を用いて、HeLa細胞を同時トランスフェクションした。ジャンクション配列発現プラスミド pB2A2-luc は、BCR-ABLジャンクションを包含する300ヌクレオチドの配列を含んでいた。プラスミド pABL-lucは、正常型ABL mRNAのエキソン1とエキソン2の間のジャンクションを包含する300ヌクレオチドの配列を含んでいた。それぞれの細胞溶解物中で両遺伝子を一過性に発現させた後、我々はリシフェラーゼ活性を測定することにより各酵素の細胞内活性を推定した。

#### 実験方法

#### 転写によるtRNA<sup>Val</sup>-酵素の調製

図13に示すtRNA<sup>Val</sup>-酵素発現ベクターは、転写用のDNA鋳型を構築するためのPCRのDNA鋳型として用いた。各鋳型についてプライマーを合成し、センス鎖はT7プロモーターを含んでいた。in vitroにおけるT7転写および精

製を文献に記載されているように実施した (Kuwabaraら, 1996)。

#### 一過性トランスフェクション後のレポーター活性のアッセイ

PicaGene Kit (東洋インキ、東京、日本) を用いて文献 (Kosekiら, 1998) に記載されているようにルシファゼラッセ活性を測定した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を参考にしてトランスフェクションの効果を標準化するために、pSV- $\beta$ -ガラクトシダーゼコントロールベクター (Promega, Madison, WI) を用いて細胞を同時にトランスフェクトした。次に、発光 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子レポーター系 (C1 ontech, Palo Alto, CA) を用いて Kosekiらの方法に従って $\beta$ -ガラクトシダーゼによる化学発光シグナルを定量化した (Kosekiら, 1998)。

#### 結果

標的遺伝子発現プラスミド (pB2A2-luc または pAbL-luc) を用いた場合に記録されたルシファゼ活性を100%とした (図14)。tRNA<sup>Val</sup>部分 (pV) 単独の発現は、何ら抑制効果を示さなかった。対照的に、新規なマキシザイム (pV-MzL/R) は細胞培養物中でBCR-ABL-ルシファゼ遺伝子を抑制するのに極めて効果的であった (>95% 抑制) (図14、右パネル)。そして、このマキシザイムはABL-ルシファゼ遺伝子の発現に対しては何ら抑制効果を有さなかった (図14、左パネル)。このことは上記マキシザイムの極めて高い特異性を示している。予想された通り、上記マキシザイムと同一の部位を標的とする従来のハンマーヘッド型リボザイム (pVwRz) は、BCR-ABL-ルシファゼ遺伝子およびABL-ルシファゼ遺伝子の両方の発現を抑制した。高い特異性をもつものと最初に予想されたにもかかわらず、従来のアンチセンス付加型リボザイム (pVasRz81およびpVasRz52) もまたBCR-ABL-ルシファゼ遺伝子およびABL-ルシファゼ遺伝子の両方の発現を抑制し、非特異的に作用したことに注意することが重要である。このことはin vitroにおける我々の以前の発見と一致していた (Kuwabaraら, 1997)。さらに、従来の (アンチセンス付加型) リボザイムによる抑制の程度はマキシザイムによる抑制ほど大きくなかった。

マキシザイムの各サブユニット (MzLおよびMzR) は何ら抑制効果を有さなかった。したがって、マキシザイムの活性は哺乳動物細胞中での活性なヘテロ二量体の形成から生じるに違いない。さらに、マキシザイムは、マキシザイムに

よる潜在的切断部位を有する関連したABL-ルシファゼ遺伝子に影響を及ぼすことなくBCR-ABL-ルシファゼ遺伝子の発現を特異的に抑制したので、完全なアロステリック制御が哺乳動物細胞中で働いたに違いない。我々の知るかぎり、これは人為的に作製された酵素の活性の、哺乳動物細胞中における完全なアロステリック制御の最初の事例である。

(実施例8) ヒトL6 BCR-ABL mRNAを発現するBaF3細胞系 (BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>)、およびtRNA<sup>Val</sup>-リボザイムまたはtRNA<sup>Val</sup>-マキシザイムを形質導入したBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> およびH9細胞系の安定な形質転換体の作製

マキシザイムはHeLa細胞中でレポーター遺伝子構築物に対して効率的に且つ特異的に作用したので (実施例7)、我々は内因性のBCR-ABL (L6 b2a2 mRNA) 標的に対するマキシザイムの活性を調べることにした。我々は、p210<sup>BCR-ABL</sup>を発現するプラスミド構築物 (pMX/p210<sup>BCR-ABL</sup>; p210<sup>BCR-ABL</sup>はヒトL6 b2a2 mRNAから作製した) を組み込むことにより、ヒトL6 b2a2 mRNAを持続的に発現するマウス細胞系 BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> を確立した。この細胞系 (L6 b2a2 mRNAを発現する) は、Daley および Baltimore (1988) および Chooら (1994) が以前に用いた細胞系 (K28 b3a2 mRNAを発現するBaF3+p210細胞) とは異なることを強調すべきであろう。親であるBaF3細胞系はインターロイキン3 (IL-3) 依存性造血細胞系 (Daley および Baltimore, 1988; 図15の左パネル) であるが、形質転換されたBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> は p210<sup>BCR-ABL</sup> のチロシンキナーゼ活性のゆえにIL-3非依存性であった。したがって、後者の形質転換細胞はIL-3の不在下で増殖することができた (図15、右)。しかし、p210<sup>BCR-ABL</sup> の発現が抑制されたならば、BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞はIL-3依存性となり、IL-3の不在下では該細胞はアポトーシスを起こすに違いない。したがって、マキシザイムまたはリボザイムを形質導入したBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞の選択の際には、我々はIL-3の供給源として10% WEHIでならしたRPMI培地を用いた。IL-3の存在下で、プラスミドpV、pVwRzおよびpV-MzL/R (図13) を用いてBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞を別々にトランスフェクトした。これらのプラスミドは全てピュロマイシン耐性遺伝子をコードしていた。tRNA<sup>Val</sup>、w t R z またはマキシザイム構築物を安定に形質導入したBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞を作製するため、トランスフェクションの24時間後に10% FCSおよび3  $\mu$ g/mlのビ



ユーロマイシンを補充したRPMI培地に交換した。形質導入細胞をさらに60時間培養し、次にアポトーションスをアッセイするためIL-3を培地から除去した（下記参照；図18～21に結果を示す）。

マキシザイムの特異性を調べるため、我々はヒトT細胞由来のH9細胞も使用し、コントロールとして正常型ABL m R N A の発現に対する効果も調べた。マキシザイムまたはリボザイム構築物を担持する安定に形質導入されたH9細胞は、上記の各プラスミドを用いて作製した。トランスフェクションの効率が非常に低かったため、我々はレトロウイルスのプロデュサー細胞系（BOSC23細胞）を用いて形質導入細胞を作製した。プラスミドpV、pVwtRzまたはpV-MzL/Rを用いてトランスフェクトしたBOSC23細胞の上清を濾過し、H9細胞に加えた。このH9細胞を72時間培養し、次に耐性細胞の選択のためにピューロマイシンを添加した。形質導入細胞の種々の系は、我々が（レポーター構築物ではなく）内因性標的遺伝子に対するマキシザイムおよびリボザイムの活性および特異性を調べることを可能とした。

#### 実験方法

##### BaF3/p210<sup>Bcr-Abl</sup>細胞系の構築

IL-3の供給源としてWEHIならし培地の存在下で増殖させたBaF3細胞をレトロウイルス感染させることによって、ヒトL6 BCR-ABL m R N A を安定に発現する細胞を得た。Mullerらの手順にしたがって（Mullerら, 1991）、pMX-p210<sup>Bcr-Abl</sup>ベクター（ヒトL6 BCR-ABL m R N A をコードする）を有するBOSC23細胞中にヘルパーをもたないレトロウイルスストックを産生させた。BaF3細胞のレトロウイルス感染を、Pendergastらの方法に従って実施した（Pendergastら, 1993）。感染の72時間後にIL-3を除去し、融合遺伝子を発現する集団の選択を可能とした。BaF3/p210<sup>Bcr-Abl</sup>細胞は、10%サン胎児血清（FCS; Gibco-BRL, Rockville, MD）および3 μg/mlのピューロマイシン（Gibco-BRL）を補充したRPMI-1640培地で維持した。

##### 〔実施例9〕マキシザイムの効率的発現および細胞質への効率的輸送

発現レベルおよび発現されたリボザイムの半減期に加えて、リボザイムとその標的の共同局在は明らかにリボザイムのin vivoにおける有効性の決定要素である（SullengerおよびCech, 1993; EcksteinおよびLilley, 1996; Bertrandら, 1

997）。それゆえ、我々のt R N A<sup>Y61</sup>-酵素のそれぞれの細胞内局在を確認することが不可欠である。BaF3/p210<sup>Bcr-Abl</sup>細胞におけるマキシザイムの発現および相対的安定性を確認するため、我々はノーザンブロット分析を実施した（図16および17）。種々のプラスミドを用いてトランスフェクトしたBaF3/p210<sup>Bcr-Abl</sup>細胞の全R N A をトランスフェクションの2、4、6、12、18、24、30および36時間後に抽出した。また、全R N A のサンブルは核面分および細胞質面分に分離した。

#### 実験方法

##### ノーザンブロット分析

BaF3/p210<sup>Bcr-Abl</sup>細胞における標的m R N A およびt R N A<sup>Y61</sup>-酵素転写物の発現をアッセイするため、ISOGEN<sup>TM</sup>（ニッポンジーン、富山）を用いて全R N A を単離した。細胞質R N A および核R N A をHuang およびCarmichaelの方法に従って分離した（HuangおよびCarmichael, 1996）。1レーンあたり30 μg の全R N A をアガロースゲル（FMC Inc., Rockland, ME）に負荷し、次にR N A バンドをHybond-<sup>NM</sup>ナイロン膜（Amersham Co., Buckinghamshire, UK）に転写した。T4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造、京都、日本）によって<sup>32</sup>Pで標識してあるMz L、Mz R、wt R およびL6 BCR-ABLジャンクションの配列（図10）に相補的な合成オリゴヌクレオチドをプローブとして上記ナイロン膜を釣り上げた。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションをKosekiらの方法に従って実施した（Kosekiら, 1998）。

#### 結果

サイズがMz Lに一致する、長さ約130ヌクレオチドの転写物が検出された（図16）。最初からMz L転写物は細胞質面分に見いだされ、核面分には全く検出されなかった（図16）。細胞質におけるマキシザイムレベルの経時変化を図16の右側のパネルに示す。Mz Lは4時間以内に検出され、その発現レベルはトランスフェクションの24時間後に平坦域に達した。

次に、我々は各マキシザイムおよびリボザイムをコードするプラスミドを用いて安定に形質導入したBaF3/p210<sup>Bcr-Abl</sup>細胞におけるMz L、Mz R およびwt R z の定常レベルおよび局在を調べた。この分析には、前の文節に記載したIL-3の除去後3日目に単離した全R N A（図17）を用いた。図17の結果は、各t R

NA<sup>val</sup>-酵素が有意なレベルで発現されたこと、およびそれらの転写物が明らかに安定であったこと、を明確に示している。さらに、全ての tRNA<sup>val</sup>-酵素が細胞質画分に見いだされた。核画分に有意なレベルで見いだされたものはなかった。核内にとどまる U6 snRNA の局在の分析 (Terns ら, 1993) を対照として本研究に含めた (図 1 6、1 7)。H 9 細胞における各 tRNA<sup>val</sup>-転写物の類似した安定性および細胞質への局在もまたノーザンブロット分析により確認された (データは記載していない)。

一過性に発現された転写物 (図 1 6) および安定な形質転換体における転写物 (図 1 7) の両方が安定であり、かつ標的と細胞質中に共局在していたという発見は、我々の改変した tRNA<sup>val</sup>-発現系が包蔵する将来の遺伝子療法における有用性を強調するのに役立つ。

(実施例 1 0) 内因性の BCR-ABL 細胞性標的に対するマキシザイムの活性および特異性

我々はアポトーシスの調節におけるマキシザイムの機能的な重要性を検討した。我々は野性型リボザイム (pVwtRz)、マキシザイム (pV-MzL/R) または親ベクター (pV) をコードするプラスミドを用いて、L6 BCR-ABL (b2a2) mRNA を安定に発現する BaF3 細胞をトランスフェクトし、24 時間後にピュロマイシンに暴露して細胞を選択した。ピュロマイシンの存在下で 60 時間インキュベートした後、死滅細胞を Fico11 によって除去し、ピュロマイシン耐性細胞は IL-3 を含まない培地で種々の時間培養した。トリパンブルー色素を排除する能力によって細胞の生存率をアッセイした。BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞の他に、正常型 ABL mRNA を高レベルで発現する H 9 細胞をコントロールとして用いた。

#### 実験方法

#### 細胞生存率およびアポトーシス

細胞生存率はトリパンブルー排除によって測定した。アポトーシスは Reuther らの方法に従って測定し (Reuther ら, 1998)、核形態を調べるため 10  $\mu$ g/ml の Hoechst33342 (ニッポンジーン、富山) を用いて細胞を 15 分間染色した。洗浄し、90% グリセロール/20 mM Tris (pH 8.0)/0.1% N-没食子酸プロピルを用いてマウントした後、蛍光顕微鏡 (ニコン、東京) を用いてスライドを検査した。

#### 結果

図 1 8 に示すように、マキシザイムを発現する BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞は、コントロールプラスミドを用いてトランスフェクトした BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> (pV) 細胞と比較して加速された速度で死亡した。結果を図に示したこの実験において、マキシザイムをトランスフェクトした BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞は、例えば、IL-3 除去の 10 日後には約 20% しか生き残っていないかった。これに対して、BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> (pV) 細胞はほぼ 100% 生き残っていた (図 1 8、左)。さらに、マキシザイムは正常型 ABL mRNA を発現する H 9 細胞を殺さなかった (図 1 8、中央)。これは、キメラ BCR-ABL 遺伝子を標的とする高い特異性を示す結果である (直接証拠については下記参照)。対照的に、従来のハンマーヘッド型リボザイム wtRz は、BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞および H 9 細胞の両方にアポトーシスを誘導した (図 1 8、左および中央)。このことは、wtRz が *in vitro* および培養細胞において BCR-ABL 遺伝子と正常な ABL 遺伝子の両方の転写物を標的にするという観察 (図 1 2 および 1 4) に一致する。さらに、マキシザイムは、野性型リボザイムまたは親ベクターを発現する細胞と比較して、フィラデルフィア染色体を有する白血病患者由来の BV173 細胞 (東京大学医科学研究所より入手) に大々的に細胞死を引き起こした (図 1 8、右)。

死亡細胞を DNA 結合蛍光色素 Hoechst33342 で染色して顕微鏡で調べると、濃縮されたクロマチン、断片化された核および縮まった細胞サイズを含む典型的なアポトーシス形態が明らかになった (図 1 9)。マキシザイム (pV-MzL/R) が正常な H 9 細胞に影響を及ぼすことなく BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞に特異的にアポトーシスの細胞死を引き起こしたことは明らかであった。これに対して、リボザイム (pVwtRz) は BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞および H 9 細胞の両方にアポトーシスを誘導した。予想されたように、コントロール tRNA<sup>val</sup> mRNA 単独 (pV) の発現はどちらの細胞の形態も変化させなかった。BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞において、マキシザイムによって誘導されたアポトーシスのレベルは wtRz によって誘導されたそれよりも高かった。これは、マキシザイムの内因性標的に対する従来のリボザイムよりも高い切断活性を示すものである。

(実施例 1 1) マキシザイムおよびリボザイムによる L6 BCR-ABL mRNA の切

### 断および増強されたプロカスパーゼ-3の活性化の直接証拠

マキシザイムおよびリボザイムはアポトーシスのBCR-ABL媒介抑制を克服したので、我々はノーザンブロット分析によって予想される切断産物の直接検出を試みた(図20)。IL-3除去の0.5、1、3および5日後に、tRNA<sup>Val</sup>-酵素を形質導入したBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>細胞の全RNAを抽出した。L6 BCR-ABL mRNAのレベルをオートラジオグラムから測定した。切断産物の長さは正確に予想通りであった(約3 kb)。tRNA<sup>Val</sup>-酵素の存在下におけるL6 BCR-ABL mRNAの減少の経時変化を図20の下段パネルに示す。このグラフでは、BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>細胞中のL6 BCR-ABL mRNAの基礎レベルを100%とした(図20上段の「コントロール」と題するグラフは各測定時におけるL6 BCR-ABL mRNA発現の基礎レベルを示す)。コントロールであるtRNA<sup>Val</sup> RNA (pV) の場合、発現されたL6 BCR-ABL mRNAのレベルに減少は全く見られなかった。L6 BCR-ABL mRNAの消失速度は、マキシザイムを産生する細胞における方がw t R zを産生する細胞におけるよりも明らかに速かった。L6 BCR-ABL mRNAの半減期は、マキシザイムを産生する細胞およびw t R zを産生する細胞においてそれぞれ約3日および約10日であった。マキシザイムの発現の結果生じる内因性 BCR-ABL mRNAの切断産物は、BVI73 細胞においても確認された(データは記載していない)。これらの断片の検出は、マキシザイムおよび従来のリボザイムが培養細胞中で触媒的に活性であり、標的mRNAを特異的に切断したことを証明した。したがって我々は、図18および19に示す細胞のアポトーシスは、L6 BCR-ABL mRNAがマキシザイムによって、またはL6 BCR-ABLおよびABL mRNAがリボザイムによって切断され、その結果、各造血幹細胞においてp210<sup>BCR-ABL</sup>および/またはp145 c-ABLタンパク質が枯渇したことから生じたことを確認した。p145 c-ABLタンパク質は低い固有のチロシンキナーゼ活性を有する核タンパク質である。他方、p210<sup>BCR-ABL</sup>タンパク質はアポトーシスを抑制することによって造血幹細胞の生存を延ばす、構成的に高レベルのチロシンキナーゼ活性を有する細胞質性の膜結合タンパク質である。

アポトーシスシグナルの伝達およびアポトーシスの達成には、いくつかのアパラギン独特のシステインプロテアーゼ(カスパーゼ(caspase))として知られ

ている)の協調作用(coordinated actions)が必要である。アポトーシスのBCR-ABL媒介抑制とプロカスパーゼ-3の活性化の逆の(inverse)関係が最近 Dubrezら(1998)によって証明された。それゆえ、我々はマキシザイム(またはリボザイム)媒介アポトーシス経路が実際に白血病性細胞におけるプロカスパーゼ-3の活性化をもたすかどうかを検討した。我々はマキシザイムによるp210<sup>BCR-ABL</sup>タンパク質の特異的枯渇が不活性なプロカスパーゼ-3の切断をもたらし、活性なプロカスパーゼ-3を生じて、その結果BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>細胞にアポトーシスを起こすかどうか、を問うた。カスパーゼ-3の32 kDaの不活性な前駆体(プロカスパーゼ-3)およびプロセシングされた活性なプロテアーゼであるカスパーゼ-3の両方を認識する抗体αCPP32を用いたイムノブロット分析は、我々が成熟プロセスを追跡するのを可能とした。マキシザイムの特異性を調べるため、我々はH9細胞を用いて類似の試験を行った。

### 実験方法

#### ウェスタンブロット分析

細胞溶解物を15% ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにかけた。プロカスパーゼ-3およびプロセシングされた p17 (カスパーゼ-3)の両方を認識するウサギポリクローナル抗体αCPP32 (University of South Florida, College of MedicineのHong-Gang Wang教授から好意により提供された)を用いて、アポトーシスを起こしたBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>細胞およびH9細胞におけるプロカスパーゼ-3の活性化を検出した。ブロッッキングおよび検出はDubrezらの方法に従って実施した(Dubrezら、1998)。

### 結果

プロカスパーゼ-3の基礎レベルは、BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>細胞およびH9細胞においてはほぼ同一であった(図21)。マキシザイムを形質導入したBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>細胞においては、プロカスパーゼ-3のレベルは低下し、カスパーゼ-3のp17 活性サブユニットのレベルが増大した。安定にマキシザイムを形質導入したH9細胞においては、プロカスパーゼ-3のレベルは変化しなかった。対照的に、野性型リボザイムの発現は、BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>細胞およびH9細胞の両方においてプロカスパーゼ-3のプロセシングを伴った。安定にマキシザイムを形質導入したBaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup>

CR-ABL 細胞におけるプロカスパーゼ-3 からカスパーゼ-3 への転換率は、w t R z を形質導入した BaF3/p210<sup>BCR-ABL</sup> 細胞における転換率よりも高かった。これらのデータは、マキシザイムは p210<sup>BCR-ABL</sup> タンパク質を特異的に枯渇させ、それにより白血病性細胞におけるカスパーゼ-3 の活性化を促進し、その結果アポトーシスを誘導した、という我々の結論を強化した。

#### [考察]

我々は本明細書に、特定のリン酸ジエステル結合を選択的に切断する、アロステリックに調節された RNA 触媒 (マキシザイム) の我々の知るかぎり最初の新規な設計を記載した。この設計は、活性部位から少し離れた所に位置するセンサアームによって認識される特定の短い配列 (目的配列; 図 1) との相互作用によって触媒的に活性化される二量体 RNA モチーフに基づいていた。tRNA<sup>Val</sup> を組み込んだマキシザイムの設計は、ヒト tRNA 遺伝子の tRNA<sup>Val</sup> 部分の 3' 改変側にリボザイム配列を結合させるのに我々が以前成功したことに基づいて実施した。この成功は、培養細胞において高い特異性を有する非常に活性なリボザイムをもたらし (Kawasaki ら, 1996, 1998)。我々は初め胚性物の tRNA<sup>Val</sup> 部分が tRNA<sup>Val</sup> 駆動 RNA の二量体化を妨げるのではないかと恐れていたが、二量体化の間双方の tRNA<sup>Val</sup> 部分は相手から若干離れた所に位置し、したがってそれらは二量体化プロセスを妨げないことが我々の分析によって示された (Kuwabara ら, 1998)。今回の分析は、マキシザイムの tRNA<sup>Val</sup> によって駆動される単量体ユニットの二量体化を確認した。より重要なことに、tRNA<sup>Val</sup> によって駆動されるマキシザイムは、in vitro においてのみならず (図 12) 白血病患者由来の細胞を含む種々の培養細胞においても、アロステリックエフェクター (図 5) に応答してコンホメーション変化を受ける。

人工的なアロステリック酵素の創成は現在大きな関心を持っているが (Porta および Lizardi, 1995; Tang および Breaker, 1997a, 1997b)、我々が知るかぎり、そのような酵素がこれまで動物細胞または培養細胞において試験されたことは全くなかった。我々の新規なマキシザイムは、培養細胞中で正常型 ABL mRNA を損なうことなく L6 BCR-ABL mRNA を特異的に切断し、人工的に作製したアロ

ステリック酵素の活性のアロステリック制御の最初の成功例を提供した。L6 BCR-ABL mRNA をアンチセンス分子によって破壊しようとした過去の努力においては、特異性を示すことが困難であった。p210<sup>BCR-ABL</sup> キメラタンパク質および p145 c-ABL タンパク質は共にアポトーシスの負のレギュレーターであるので (Chapman ら, 1994; Laneuville ら, 1994; Spooncer ら, 1994; Bedi ら, 1994, 1995; McGahon ら, 1994, 1995; Dubrez ら, 1998)、特異性の低いアンチセンス分子は BCR-ABL 経路をブロックすることに加えて正常型 ABL mRNA の発現を抑制することによって白血病性細胞にアポトーシスを誘導する場合がある。実際、最近の刊物には、アンチセンス分子で処理したアポトーシス性細胞において p210<sup>BCR-ABL</sup> タンパク質レベルの低下が全く観察されなかった、また、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドによる非特異的抑制はそれらの非アンチセンス様式の作用によってもたらされた、と報告されている (O'Brien ら, 1994; Maekawa ら, 1995; Mahon ら, 1995; Smeiters ら, 1995, 1997; Vaerman ら, 1995, 1997)。我々もまた、ホスホロチオエート部分の導入等のアンチセンス分子への改変の導入が、配列特異的ではない様式で細胞死を引き起こすことを認識した。我々の掌中では、BCR-ABL ジャンクションに標的を定めた未改変アンチセンス DNA およびアンチセンス付加型の従来のリボザイム (図 10 および 14) さえも、哺乳動物細胞において何ら特異性を示さなかった。それゆえ、この種の研究においては、細胞死が実際にアンチセンス分子による特異的抑制から生じることを確認することが重要である。この点は少なくとも抑制効果の推定と同じくらい重要である。我々のマキシザイムの特異性は相当高かったもので、またセンサアームおよび共通ステム I の長さおよび配列は非常に容易に調節できる変数なので、マキシザイム全般を他のキメラ mRNA も切断できるに違いない新しい種類の潜在的に強力な遺伝子不活性化剤と考えるべきである。

マキシザイムの切断活性、特に細胞におけるそれは 3 分子相互作用 (マキシザイムの tRNA<sup>Val</sup>) によって駆動される 2 つの単量体ユニットと標的基質の間の) を必要とするに相違ない。対照的に、従来のリボザイムの活性は 2 分子相互作用 (tRNA<sup>Val</sup>) によって駆動される 1 つのリボザイムとその標的の間の) を必要とする。原則として、2 分子相互作用は 3 分子相互作用よりも迅速である。この差

異は、従来のリボザイムの方が細胞中でマキシザイムよりも効果的であろうということを示すように思われる。しかし、我々の実験において幾つかの標的配列を培養細胞中で試験した際、我々はtRNA<sup>Val</sup>に駆動される二量体は対応するtRNA<sup>Val</sup>に駆動されるリボザイムよりも常に一層活性であることを見いだした(リボザイムとマキシザイムの各セットについて同一の標的部位が用いられた)。この結論は今回の分析の結果によってさらに強化された。マキシザイムはリボザイムよりも効果的にL6 BCR-ABL mRNAのジャンクションを切断した。レポーター構築物(図14)ばかりでなく、標的が内因性分子の場合も(図18~21)切断した。したがって、我々のtRNA<sup>Val</sup>発現系を用いる限り、二量体化プロセスが関与するにも関わらず、マキシザイムの細胞内活性は従来のハンマーヘッド型リボザイムのそれよりも有意に高い。

Klugのグループは正確ですっきりした(elegant)実験において、3個のジंकフィンガーモチーフからなる注意深く設計されたDNA結合ペプチドが、親ゲノム配列よりはむしろBCR-ABL融合ガン遺伝子の独特な9塩基対領域と特異的に結合することを示した(Chooら, 1994)。さらに、上記ガン遺伝子の作用によって増殖因子(IL-3)非依存性とされたマウス細胞が、上記DNA結合ペプチドを発現するベクターを用いた一過性トランスフェクションの結果、IL-3依存性に逆戻りした。p210<sup>BCR-ABL</sup>タンパク質は、IL-3またはオートクリン様式でBaF3細胞の増殖を刺激することができ他の増殖因子の内因性発現の引き金を引かないことに注意されたい。むしろ、p210<sup>BCR-ABL</sup>タンパク質は、通常はIL-3シグナル伝達経路を介して提供されるBaF3細胞の増殖のための刺激を提供する(DaleyおよびBaltimore, 1988)。Klugのグループはさらに、一過性にトランスフェクトされた細胞におけるBCR-ABL mRNAのレベルが、トランスフェクトされていない細胞中のそれに較べて24時間以内に15~18%低下することを示した。我々は、BCR-ABL mRNAのレベルにおける同様の低下(マキシザイムの場合、24時間以内に35%低下; 図20)がIL-3への依存性を取り戻すことを見いだした(図18)。

脱調節されたBCR-ABLクロニキンナーゼがアポトーシス性細胞死を遅延させる機構はまだ殆ど解明されていない。アポトーシスシグナルの伝達およびアポトーシスの達成は、幾つかのカスパーゼの協調作用を必要とする。今日までに同定さ

れた10個のヒトカスパーゼは、構造およびヒト始原型であるインターロイキン1 $\beta$ 転換酵素(ICE)および線虫始原型であるCED-3との相同性の程度に基づいて4つのサブファミリーに分類することができ(Alnemriら, 1996)。細胞中で過剰に発現されるとアポトーシスを引き起こすに達しないこれらカスパーゼの全ては、最初は、活性なプロテアーゼを生じるためにはアスパラギン酸残基から速く離れた位置で切断を必要とする1本鎖の不活性なプロ酵素として合成される。最近の証拠が、アポトーシスにおけるカスパーゼの活性化はタンパク質分解カスケードを介して起こることを示した。例えば、カスパーゼ-4はプロカスパーゼ-1を活性化し、これが次にプロカスパーゼ-3を切断して活性なカスパーゼ-3を生じ、これがAsp-Glu-Val-Asp (DEV D)モチーフを認識してポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼを切断する(Enariら, 1996)。カスパーゼ-1をもたないマウスはプログラムされた細胞死においていかなる表現型も示さなかった(Liら, 1995)が、カスパーゼ-3を欠くマウスは脳における過形成および細胞の無秩序な発生を示した(Kuidaら, 1996)という発見は、カスパーゼ-1はあらゆる種類の細胞において過多であるのに対し、カスパーゼ-3は脳のある部分でアポトーシスにおいて重要な役割を果たすのではないかと示唆している(Nagata, 1997)。アポトーシスのBCR-ABL媒介抑制において、BCR-ABL細胞系ではアポトーシス経路がプロカスパーゼ-3活性化の上流で中断される(Dubrezら, 1998)というごく最近の発見が、本研究によって確認された。マキシザイムの発現によるp210<sup>BCR-ABL</sup>の枯渇は、不活性なプロカスパーゼ-3のプロセシングを明らかに促進し、活性なカスパーゼ-3を生じた(図21)。マキシザイムによるL6 BCR-ABL

mRNAの選択的切断およびその結果としてのカスパーゼ-3の活性化(これは白血病的細胞にアポトーシスをもたらしたが、正常細胞にはもたらさなかった)は、我々の設計した新規なマキシザイムが細胞中で十分機能性であることを実証した。

結論として、(1)我々の新規なマキシザイムは、L6 BCR-ABL mRNAの切断のために、細胞中で高レベルの活性を有するヘテロ二量体構造を形成したこと、および(2)切断活性は、L6 BCR-ABL mRNAのジャンクションの存在下でのみマキシザイムが活性な触媒コアを形成するように細胞内でアロステリックにうまく制御されたこと、を我々は示した。マキシザイムは同じように転写された標

準的リポザイムよりも細胞中で一層効果的であった。我々の知るかぎり、我々の新規なマキシザイムはその極めて高い基質特異性ゆえに今日までに報告された他の核酸に基づく薬物よりも優れている。この種類のマキシザイムは慢性骨髄性白血病 (CML) の治療、特に L6 転座の場合に有用であろう。

#### 【実施例 1 2】マキシザイムの *in vivo* (動物実験) の効果

このマキシザイムは *in vivo* (動物実験レベル) でも効いた実験結果が得られた。簡単に説明すると、慢性骨髄性白血病にしたマウスにマキシザイムを導入したところ、非常に良く癌化が抑制されたのである。

#### 実験方法

まず、マウスを癌化させるために、b2a2 type の CML ヒト患者由来の細胞 (CML 転座型のうち L6 転座型の患者由来、まだ cell line 化していないもので、東京大学医科学研究所病態薬理学研究部より入手した。) を用いた。この腫瘍細胞に、マキシザイムを組み込んだウイルスベクター pMX puro/Dimer (実施例 8, 1 0 及び 1 1 の pV-HzL/R) と、コントロールとなる何も組み込んでいないウイルスベクター pMX puro (Kitamura ら, 1995) を感染させた。詳しい感染条件は、stroma cell (骨髄間質細胞; 骨髄から取り出した細胞を培養する際に増えてくる緑線芽細胞様の接着細胞。サイトカインを分泌し、血球系細胞の増殖を促進する。本実施例では、東京大学医科学研究所病態薬理学研究部より入手した。) の上で上記の CML 細胞 1x 10<sup>7</sup> 乗に、ウイルスベクター (titer 1x10<sup>5</sup> 乗) 10 ml を polybrene 10 microgram/ml 下で感染 (m.o.i. 0.1) させた。ウイルスベクターには puromycin 耐性遺伝子が組み込まれてあるため、感染開始 72 時間後から puromycin 0.5 mg/ml を培養液に加えることにより、マキシザイムが組み込まれた細胞のみを選択できる (選択時間は 72 時間)。これらの、マキシザイムを導入された患者由来の腫瘍細胞と、マキシザイムを導入していない腫瘍細胞を、それぞれマウスに注入した。用いたマウスは NOD-SCID マウス (Non obesity diabetes-systemic combined immunodeficiency mouse; 非肥満型糖尿病-複合型免疫不全マウス、従来の SCID マウスに比べて免疫能がより低く、種々のヒトの細胞移植が可能なマウス。本実施例では、東京大学医科学研究所病態薬理学研究

部より入手した。) である。このマウスの尾静脈に、puromycin で選択後の腫瘍細胞 1 x 10<sup>6</sup> 乗を注入した。マウスには投与前に放射線照射して更に免疫能を落とすこともあるが、今回は照射していない。

#### 結果

細胞注入後、1 1 週目にマウスを解剖した結果を図 2 2 ~ 2 4 に示す。Mz(-) はマキシザイムを導入していない腫瘍細胞を注入したマウス、Mz(+) はマキシザイムを導入した腫瘍細胞を注入したマウスである。図 2 2 は解剖前のマウスの写真 (この時点で体重を測定、表 1 参照)、図 2 3 は脾臓の写真 (矢印で示した部位)、図 2 4 が胸腺周囲のリンパ節の写真である。図 2 2 をみて分かるように、Mz(-) に比べて、Mz(+) は全体にふっくらして元気良く生育していることが分かる。実際に体重を測定すると (表 1)、Mz(-) が 2 4 g、Mz(+) は 3 4 g で 1 0 g も (通常の NOD-SCID マウスの 3 分の 1) 体重差があることが分かった。つまり、Mz(-) は癌化が進行し、痩せ衰えていることを示したものである。次に、マウスを解剖して脾臓を比較した (図 2 3)。Mz(-) は明らかに癌化が進行して脾臓が肥大 (0.2 1 g) しているのに対し、マキシザイムを導入したマウスは、健康体と変わらず (0.0 8 g) 脾臓は肥大していない。同様に、胸腺周囲のリンパ節を比較したものが図 2 4 であるが、マキシザイムを導入したマウスのリンパ節に (0.0 3 g) に対して、Mz(-) のリンパ節 (0.2 7 g) は、癌化が進行した形態を示している。

さらに、同マウスの骨髄の写真を図 2 5 に示す。Mz(-) の骨髄はほとんどが腫瘍細胞で占められているのに対して、マキシザイムを導入したマウス Mz(+) の骨髄は、健康体の骨髄液と同様の形状 (腫瘍細胞ではなく、リンパ球等の細胞が混在している) が観察された。

現在、臨床で行われている白血病の治療法のうち、有効性が確認されているのは骨髄移植しかない。しかし、骨髄移植はどの患者にも適用できるわけではなく、またその骨髄提供者も多くない。そのため、より一般的に適用でき、かつ安全な治療法が望まれている。今回の結果では、マキシザイムは動物実験レベルでも、非常に高活性で CML の癌化を効率良く抑制し、毒性も認められなかった。

マキシザイムは、従来の治療法に比べて患者への適用性も幅広いことから、慢性骨髄性白血病の今後の遺伝子治療に大きく貢献するであろう。

表 1

	体重	脾臓	胸腺周囲のリンパ節
コントロール(Mz(-))	24 g	0.21 g	0.27 g
マキシザイム(Mz(+))	34 g	0.08 g	0.03 g

#### 産業上の利用可能性

本発明のマキシザイムを用いれば、染色体上の相互転座などが引き金となり発病する慢性骨髄性白血病において産生される異常なL6(b2a2)キメラ型mRNAの発現を、正常型mRNAに全く影響を与えずに、特異的に抑制することができる。従って、本発明のマキシザイムは、慢性骨髄性白血病の遺伝子治療や慢性骨髄性白血病の原因となるL6(b2a2)キメラ型mRNAの発現抑制剤として利用できる。

#### (参考資料)

- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Amontov, S., and Taira, K. (1996). Hammerhead minizymes with high cleavage activity: a dimeric structure as the active conformation of minizymes. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 1624-1628.
- Baier, G., Coggeshall, K. M., Baier-Bitterlich, G., Giampa, L., Telford, D.,

Herbert, E., Shih, W. and Altman, A. (1994). Construction and characterization of Ick-and fyn-specific tRNA:ribozyme chimeras. *Mol. Immunol.*, 31, 923-932.

Bedi, A., Zehnbauner, B. A., Barber, J. P., Sharkis, S. J., and Jones, R. J. (1994). Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 83, 2038-2045.

Bedi, A., Barber, J. P., Bedi, G. C., el-Deiry, W. S., Sidransky, D., Vala, M. S., Akhtar, A. J., Hilton, J., and Jones, R. J. (1995). BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage : a mechanism of resistance to multiple anti-cancer agents. *Blood* 86, 1148-1153.

Bartram, C. R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., van Kessel, A. G., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M. A., Davies, T., Stone, M., Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., and Groffen, J. (1983). Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 306, 277-280.

Bertrand, E., Castanotto, D., Zhou, C., Carbone, C., Lee, G. P., Chatterjee, S., Grange, T., Pictet, R., Kohn, D., Engelke, D., and Rossi, J. J. (1997) The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA* 3, 75-88.

Birikh, K. R., Heaton, P. A., and Eckstein, F. (1997). The hammerhead ribozyme structure, function and application. *Eur. J. Biochem.* 245, 1-16.

Chapman, R. S., Whetton, A. D., and Dive, C. (1994). The suppression of drug-induced apoptosis by activation of v-abl protein tyrosine kinase. *Cancer Res.* 54, 5131-5137.

Choo, Y., Sanchez-Garcia, I., and Klug, A. (1994). In vivo repression

by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature* 372, 642-645.

Dahn, S.C., Derrick, W.B. and Uhlenbeck, O.C. (1993) Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* 30, 9464-9469.

Daley, G.Q., and Baltimore, D. (1988). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210<sup>bcr/abl</sup> protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9312-9316.

Dubertz, L., Eymen, B., Sordet, O., Droin, N., Turhan, A.G. and Solary, E. (1998). BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood* 7, 2415-2422.

Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. (eds.) (1996). *Catalytic RNA, Nucleic Acids and Molecular Biology*, vol. 10. Springer-Verlag, Berlin.

Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W., and Nagata, S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380, 723-726.

Fu, D.J., Bensele, F. and McLaughlin, L.W. (1994). Hammerhead ribozymes containing non-nucleoside linkers are active RNA catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4591-4598.

Geiduschek, E.P. and Tocchini-Valentini, G.P. (1988). Transcription by RNA polymerase III. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 873-914.

Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R., and Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal break-points are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36, 93-99.

Haseloff, J., and Gerlach, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endonuclease activities. *Nature* 334, 585-591.

Heisterkamp, N., Stephenson J.R., Groffen, J., Hansen, P.F., de Klein,

A., Bartram, C.R., and Grosveld, G. (1983). Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 306, 239-242.

Hertel, K.J., Herschlag, D., and Uhlenbeck. (1996). Specificity of hammerhead ribozyme cleavage. *EMBO J.* 15, 3751-3757.

Huang, Y. and Carmichael, G.G. (1996). Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1534-1542.

James, H., Mills, K., and Gibson, I. (1996). Investigating and improving the specificity of ribozymes directed against the bcr-abl translocation. *Leukemia* 10, 1054-1064.

Kawasaki, H., Ohkawa, J., Tanishige, N., Yoshinari, K., Murata, T., Yokoyama, K.K. and Taira, K. (1996). Selection of the best target site for ribozyme-mediated cleavage within a fusion gene for adenovirus E1A-associated 300 kDa protein (p300) and luciferase. *Nucleic Acids Res.* 24, 3010-3016.

Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T.-P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D.M. and Yokoyama, K.K. (1998). Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 393, 284-289.

Kazakov, S. and Altman, S. (1992). A trinucleotide can promote metal ion-dependent specific cleavage of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7939-7943.

Kearney, P., Wright, L.A., Milliken, S., and Biggs, J.C. (1995). Improved specificity of ribozyme-mediated cleavage of bcr-abl mRNA. *Exp. Hematol.* 23, 986-989.

Kitamura, T., Onishi, M., Kinoshita, S., Shibuya, A., Miyajima, A. and Nolan, G.P. (1995) Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9146-9150.

Konopka, J.B., Watanabe, S.M., and Witte, O.N. (1984). An alteration of



the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37, 1035-1042.

Koseki, S., Ohkawa, J., Yamamoto, R., Takebe, Y. and Taira, K. (1998). A simple assay system for examination of the inhibitory potential in vivo of decoy RNAs, ribozymes and other drugs by measuring the Tat-mediated transcription of a fusion gene composed of the long terminal repeat of HIV-1 and a gene for luciferase. *J. Control. Release* 53, 159-173.

Kronenwett, R., Haas, R. and Sczakiel, G. (1996). Kinetic selectivity of complementary nucleic acids: bcr-abl-directed antisense RNA and ribozymes. *J. Mol Biol.* 259, 632-644.

Kuida, K., Zheng, T.S., Na.S.-Q., Kuan, C.-Y., Yang, F., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.

Kuwabara, T., Amontov, S., Warashina, M., Ohkawa, J. and Taira, K. (1996). Characterization of several kinds of dimer minizyme: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA by dimer minizymes. *Nucleic Acids Res.* 24, 2302-2310.

Kuwabara, T., Warashina, M. Tanabe, T., Tani, K., Asano, S., and Taira, K. (1997). Comparison of the specificities and catalytic activities of hammerhead ribozymes and DNA enzymes with respect to the cleavage of BCR-ABL chimeric L6(b2a2) mRNA. *Nucleic Acids Res.* 25, 3074-3082.

Laneuville, P., Timm, M., and Hudson, A.T. (1994). Bcr/abl expression in 32D cl3(G) cells inhibits apoptosis induced by protein tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 54, 1360-1368.

Lange, W., Cantin, E. M., Finke, J., and Dolken, G. (1993). In vitro and in vivo effects of synthetic ribozymes targeted against BCR/ABL mRNA. *Leukemia* 7, 1786-1794.

Lange, W., Daskalakis, M., Finke, J., and Dolken, G. (1994). Comparison of different ribozymes for efficient and specific cleavage of BCR/ABL related mRNAs. *FEBS Lett.* 338, 175-178.

Leopold, L.H., Shore, S.K., Newkirk, T.A., Reddy, R.M.V., and Reddy, P. (1995). Multi-unit ribozyme-mediated cleavage of bcr-abl mRNA in myeloid leukemias. *Blood* 85, 2162-2170.

Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnson, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., et al. (1995). Mice deficient in IL-1b-converting enzyme are defective in production of mature IL-1b and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80, 401-411.

Long, D.M. and Uhlenbeck, O.C. (1994). Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6977-6981.

Maekawa, T., Kimura, S., Hirakawa, K., Murakami, A., Zon, G., and Abe, T. (1995). Sequence specificity on the growth suppression and induction of apoptosis of chronic myeloid leukemia cells by BCR-ABL anti-sense oligonucleoside phosphorothioates. *Int. J. Cancer* 62, 63-69.

Mahon, F.X., Ripoche, J., Pigeonnier, V., Jazwicz, B., Pigneux, A., Moreau, J.F., and Reiffers, J. (1995). Inhibition of chronic myelogenous leukemia cells harboring a BCR-ABL B3A2 junction by antisense oligonucleotides targeted at the B2A2 junction. *Exp. Hematol.* 23, 1606-1611.

McCall, M. J., Hendry, P. and Jennings, P.A. (1992). Minimal sequence requirements for ribozyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5710-5714.

McGahan, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K.M., Green, D.R., and Cotter, T.G. (1994). BCR-ABL maintains resistance of chronic

myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83, 1179-1187.

- McGahan, A.J., Nishioka, W.K., Martin, S.J., Mahboubi, A., Cotter, T.G., and Green, D.R. (1995). Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by abl. *J. Biol. Chem.* 270, 22625-22631.
- Muller, A.J., Young, J.C., Pendergast, A.M., Pondel, M., Landau, N.R., Littman, D.R., and Witte, O.N. (1991). BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1785-1792.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497-1499.
- O'Brien, S.G., Kirkland, M.A., Melo, J.V., Rai, M.H., Davidson, R.J., McDonald, V., and Goldman, J.M. (1994). Antisense BCR-ABL oligomers cause non-specific inhibition of chronic myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 8, 2156-2162.
- Pachuk, C.J., Yoon, K., Moelling, K., and Coney, L.R. (1994). Selective cleavage of bcr-abl chimeric RNAs by a ribozyme targeted to non-contiguous sequence. *Nucleic Acids Res.* 22, 301-307.
- Pendergast, A.M., Gishizky, M.L., Havlik, M.H., and Witte, O.N. (1993). SH1 domain autophosphorylation of p210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1728-1736.
- Perriman, R. and de Feyter, R. (1997). tRNA-delivery systems for ribozymes. In Turner, P.C. (ed.), *Methods in Molecular Biology, Ribozyme Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 393-402.
- Piccirilli, J.A., Vyle, J.S., Caruthers, M.H. and Cech, T.R. (1993). Metal ion catalysis in the Tetrahymena ribozyme reaction. *Nature*

361, 85-88.

- Porta, H., and Lizardi, P.M. (1995). An allosteric hammerhead ribozyme. *Biotechnology* 13, 161-164.
- Reuther, J.Y., Reuther, G.W., Cortez, D., Pendergast, A.M., and Baldwin, Jr., A.S. (1998). A requirement for NF- $\kappa$ B activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes & Dev.* 12, 968-981.
- Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293.
- Sawata, S., Komiya, M., and Taira, K. (1995). Kinetic evidence based on solvent isotope effects for the nonexistence of a proton-transfer process in reactions catalyzed by a hammerhead ribozyme: implication to the double-metal-ion mechanism of catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 2357-2358.
- Shore, S.K., Nabissa, P.M., and Reddy, E.P. (1993). Ribozyme-mediated cleavage of the BCR-ABL oncogene transcript: in vitro cleavage of RNA and in vivo loss of P210 protein-kinase activity, *Oncogene* 8, 3183-3188.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., and Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 315, 550-553.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., Roe, B.A., and Canaani, J. (1986). Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* 47, 277-284.
- Smetters, T.F., van de Locht, L.T., Pennins, A.H., Wessels, H.M., de Witte, T.M., and Mensink, E.J. (1995). Phosphorothioate BCR-ABL antisense oligonucleotides induce cell death, but fail to reduce cellular bcr-abl protein levels. *Leukemia* 9, 118-130.
- Smetters, T.F., Linders, E.H., van de Locht, L.T., de Witte, T.M., and

Mensink, E.J. (1997) An antisense Bcr-Abl phosphodiester-tailed methylphosphonate oligonucleotide reduces the growth of chronic myeloid leukemia patient cells by a non-antisense mechanism.

Br. J.Hematol. 96, 377-381.

Snyder, D.S., Wu, Y., Wang, J.L., Rossi, J.J., Swiderski, P., Kaplan, B.E., and Forman, S.J. (1993). Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line. Blood 82, 600-605.

Sponcer, E., Fairbairn, L., Cowling, G.J., Dexter, T.M., Whetton, A.D., and Owen-Lynch, P.J. (1994). Biological consequences of p160 v-abl protein tyrosine kinase activity in primitive, multipotent hematopoietic cell line. Leukemia 8, 620-626.

Steitz, T.A. and Steitz, J.A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6498-6502.

Sullenger, B.A. and Cech, T.R. (1993). Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. Science 262, 1566-1569.

Symons, R.H. (1989). Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. Trends Biochem. Sci. 14, 445-450.

Tang, J., and Breaker, R.R. (1997a). Rational design of allosteric ribozymes. Chem. Biol. 4, 453-459.

Tang, J., and Breaker, R.R. (1997b). Examination of the catalytic fitness of the hammerhead ribozyme by in vitro selection. RNA 3, 914-925.

Terns, M., Dahlberg, J., Lund, E. (1993). Multiple cis-acting signals for export of pre-U1 snRNA from the nucleus. Genes & Dev. 7, 1898-1908.

Tuschl, T., and Eckstein, F. (1993). Hammerhead ribozymes: importance of stem-loop II activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6991-

6994.

Uhlenbeck, O.C. (1987). A small catalytic oligonucleotide. Nature 328,

596-600.

Yu, M., Leavitt, M.C., Maruyama, M., Yamada, O., Young, D., Ho, A.D., and Wong-Staal, F. (1995). Intracellular immunization of human fetal cord blood stem/progenitor cells with a ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 699-703.

Vaerman, J.L., Lammineur, C., Moureau, P., Lewalle, P., Deldime, F., Blumanfeld, M., and Martiat, P. (1995) BCR-ABL antisense oligodeoxyribonucleotides suppress the growth of leukemic and normal hematopoietic cells by a sequence-specific but nonantisense mechanism. Blood 86, 3891-3896.

Vaerman, J.L., Moureau, P., Deldime, F., Lewalle, P., Lammineur, C., Morschhauser, F., and Martiat, P. (1997). Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides Blood 90, 331-339.

Wright, L., Wilson, S.B., Milliken, S., Biggs, J., and Kearney, P. (1993).

Ribozyme-mediated cleavage of the bcr/abl transcript expressed in chronic myeloid leukemia. Exp. Hematol. 21, 1714-1718.

Zhou, D.-M., Zhang, L.-H., and Taira, K. (1997). Explanation by the

double-metal-ion mechanism of catalysis for the differential

metal ion-effects in the cleavage rates of 5'-oxy and 5'-thio

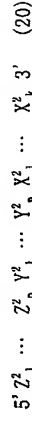
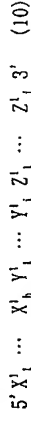
substrates by a hammerhead ribozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14343-14348.

Zhou, D.-M. and Taira, K. (1998). The hydrolysis of RNA: from theoretical calculations to the hammerhead ribozyme-mediated cleavage of RNA. Chem. Rev. 98, 991-1026.

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として  
本明細書にとり入れるものとする。

# 請求の範囲

1. 標的RNAに対してアロステリックなRNA切断活性を示す核酸酵素。
2. 下記のヌクレオチド配列(10)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(20)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有する請求項1記載の核酸酵素。



(配列中、 $X_1^1 \sim X_k^1$ 、 $X_1^2 \sim X_k^2$ 、 $Y_1^1 \sim Y_l^1$ 、 $Y_1^2 \sim Y_m^2$ 、 $Z_1^1 \sim Z_j^1$ および $Z_1^2 \sim Z_n^2$ は、各々独立に、A、U、T、CまたはGのいずれかであり、

hおよびkは1以上の整数であり、

iおよびmは1以上の整数であり、

jは1以上の整数であり、

nは1以上の整数であり、

$X_1^1 \dots X_k^1$ および $X_1^2 \dots X_k^2$ は、標的RNA中の特異的配列に相補的なヌクレオチド配列であり、

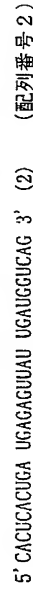
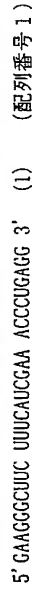
$Y_1^1 \dots Y_l^1$ および $Y_1^2 \dots Y_m^2$ は、ステムを形成するヌクレオチド配列であり、

$Z_1^1 \dots Z_j^1$ および $Z_1^2 \dots Z_n^2$ は、標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的である領域および標的RNAの存在下でのみ $Mg^{2+}$ イオンを捕捉する空洞を形成しうる領域を含むヌクレオチド配列である。)

3. 標的RNAが疾病の原因となるキメラ型mRNAである請求項1または2に記載の核酸酵素。

4. キメラ型mRNAが慢性骨髄性白血病の原因となるL6 (b2a2) キメラ型mRNAである請求項3記載の核酸酵素。

5. 下記のヌクレオチド配列(1)を含むRNA分子および下記のヌクレオチド配列(2)を含むRNA分子が形成する二量体の構造を有する請求項4記載の核酸酵素。



(ただし、ヌクレオチド配列(1)の21番目～29番目のヌクレオチドおよびヌ

クレオチド配列(2)の17番目～31番目のヌクレオチドは標的RNAの切断部位周辺の配列に相補的になるように改変されてもよい。)。

6. ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの上流にリンカー配列およびtRNA Valプロモーター配列が付加されている請求項5記載の核酸酵素。

7. ヌクレオチド配列(1)の上流に付加されているリンカー配列が下記のヌクレオチド配列(3)を含み、ヌクレオチド配列(2)の上流に付加されているリンカー配列が下記のヌクレオチド配列(4)を含む請求項6記載の核酸酵素。

5' AAA 3' (3)

5' UUU 3' (4)

8. ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの上流に付加されているtRNA Valプロモーター配列が下記のヌクレオチド配列(5)を含む請求項6記載の核酸酵素。

5' ACCGUUGGUU UCCGUAGUGU AGUGGUUAUC AGUUCGCCU AACACGGCAA AGUCCCCGG

UUCGAACCG GGCACUACAA AACCAAC 3' (5) (配列番号3)

9. ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの下流に付加配列およびターミネーター配列が付加されている請求項6記載の核酸酵素。

10. ヌクレオチド配列(1)の下流に付加されている付加配列が下記のヌクレオチド配列(6)を含み、ヌクレオチド配列(2)の下流に付加されている付加配列が下記のヌクレオチド配列(7)を含み、ヌクレオチド配列(1)および(2)のそれぞれの下流に付加されているターミネーター配列が下記のヌクレオチド配列(8)を含む請求項9記載の核酸酵素。

5' AAA 3' (6)

5' AACCGUA 3' (7)

5' UUUUU 3' (8)

11. 標的RNAが疾病の原因となる異常型mRNAである請求項1または2に記載の核酸酵素。

12. 請求項1～11のいずれかに記載の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクター。

13. 請求項1記載の核酸酵素をコードするDNAを含む発現ベクターDNAを鋳型として、RNAに転写することを特徴とする、請求項1記載の核酸酵素の製造方法。

14. 請求項1～11のいずれかに記載の核酸酵素または請求項12記載の発現ベクターを有効成分として含む医薬組成物。

15. 標的RNAが原因となって生じる疾病を予防および/または治療するための請求項14記載の医薬組成物。

16. 請求項3～10のいずれかに記載の核酸酵素を生体内で発現させて、疾病の原因となるキメラ型mRNAの発現を抑制または阻害するための請求項15記載の医薬組成物。

17. フィラデルフィア染色体異常により生じる疾病を予防および/または治療するための請求項16記載の医薬組成物。

18. フィラデルフィア染色体異常により生じる疾病が慢性骨髄性白血病である請求項17記載の医薬組成物。

19. 請求項11記載の核酸酵素を生体内で発現させて、疾病の原因となる異常型mRNAの発現を抑制または阻害するための請求項15記載の医薬組成物。

20. 請求項1記載の核酸酵素を用いて、標的RNAを特異的に切断する方法。

21. 標的RNAが疾病の原因となるキメラ型mRNAである請求項20記載の方法。

22. 疾病がフィラデルフィア染色体異常により生じるものである請求項21記載の方法。

23. フィラデルフィア染色体異常により生じる疾病が慢性骨髄性白血病である請求項22記載の方法。

24. 標的RNAが疾病の原因となる異常型mRNAである請求項20記載の方法。

図 1

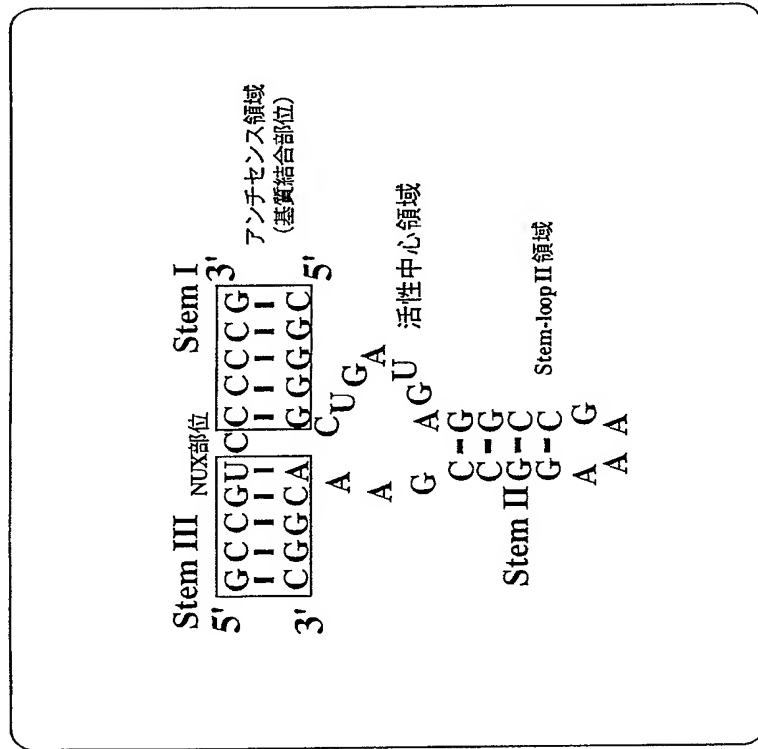


図 2

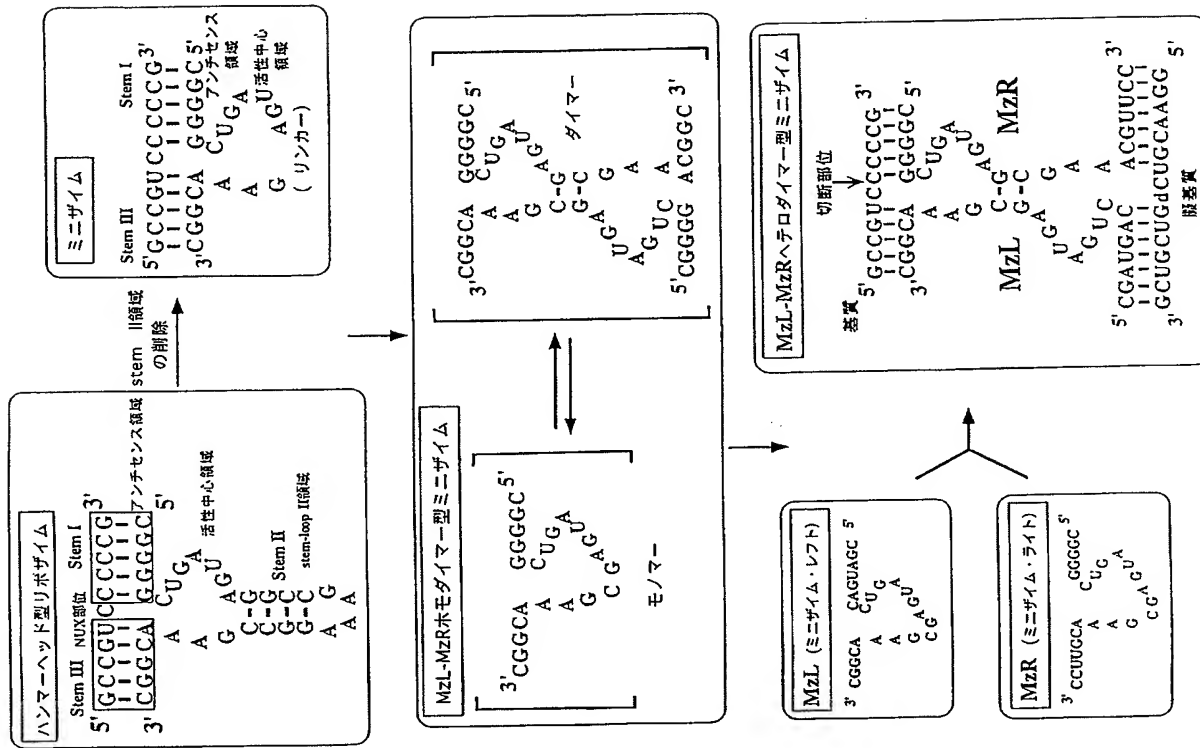


図 3

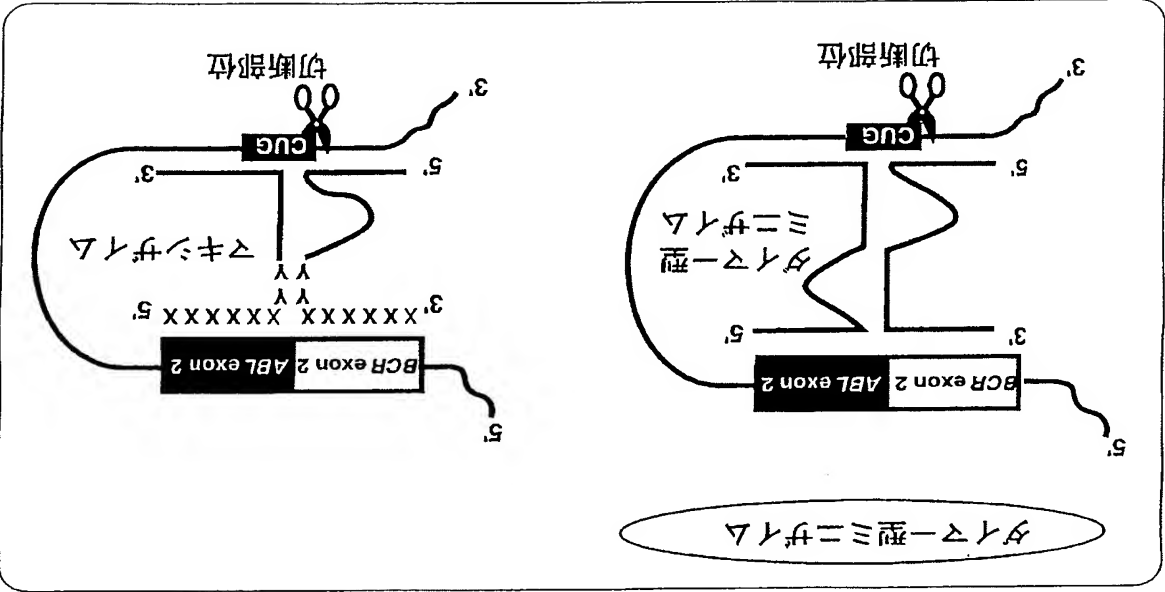


図 4

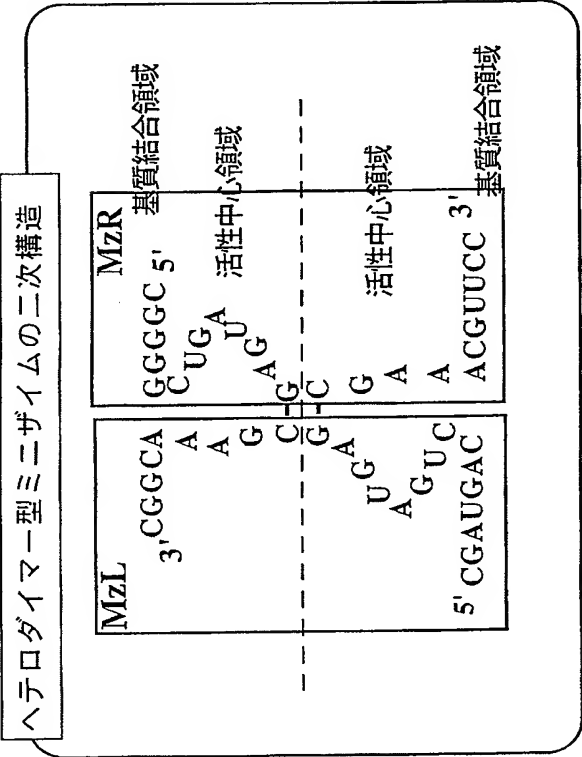


図 3

図 4





図 7

tRNA<sup>Val</sup>配列が付加したタイプの  
スーパードライマー型ミニサイムの切断活性

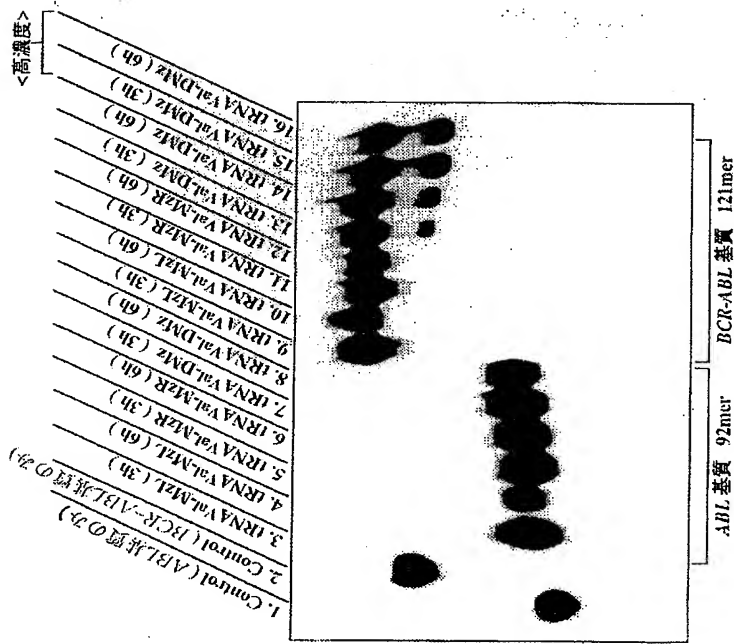


図 8

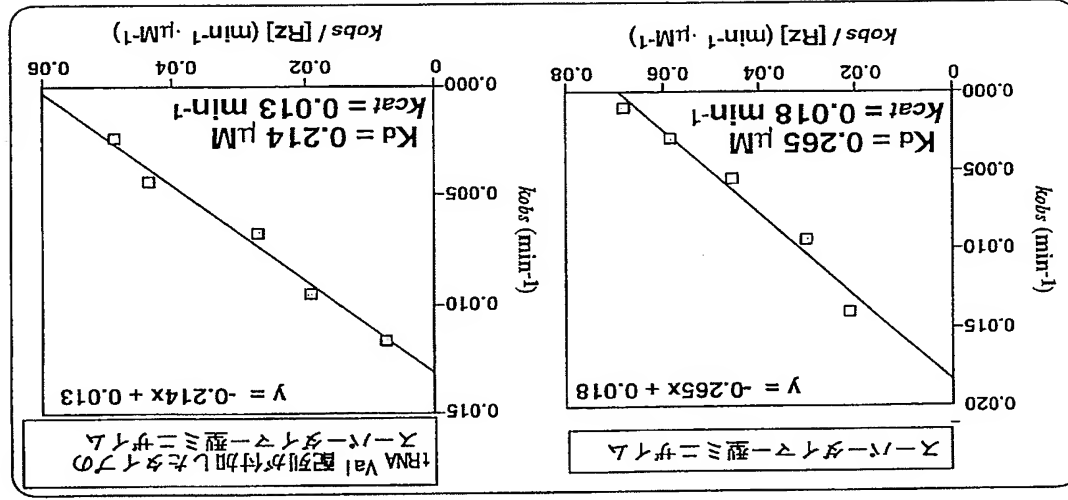


図 9

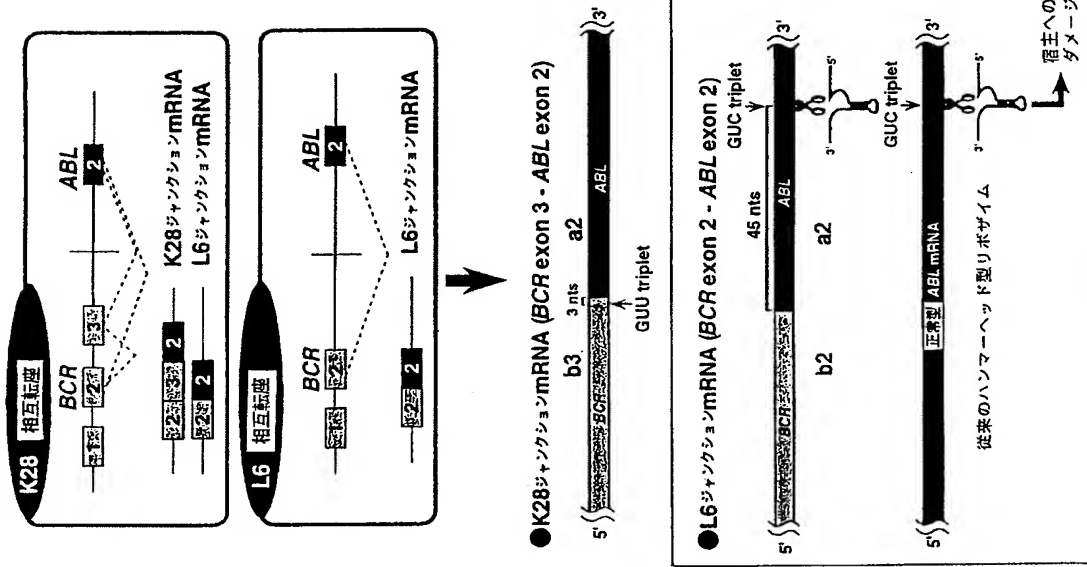


図 10

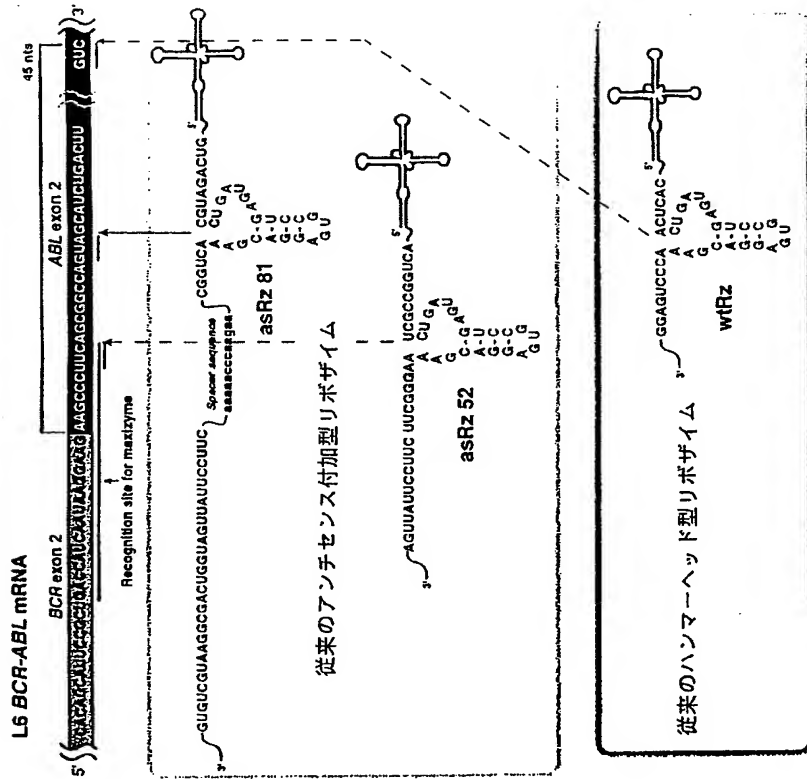


図 11

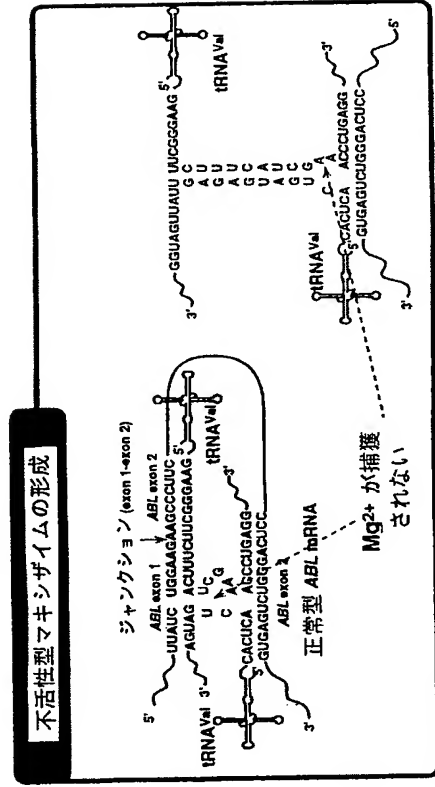
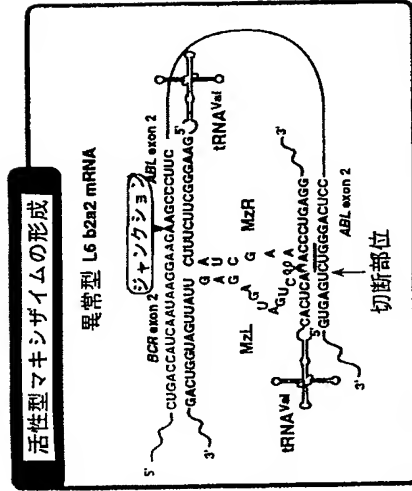


図 12

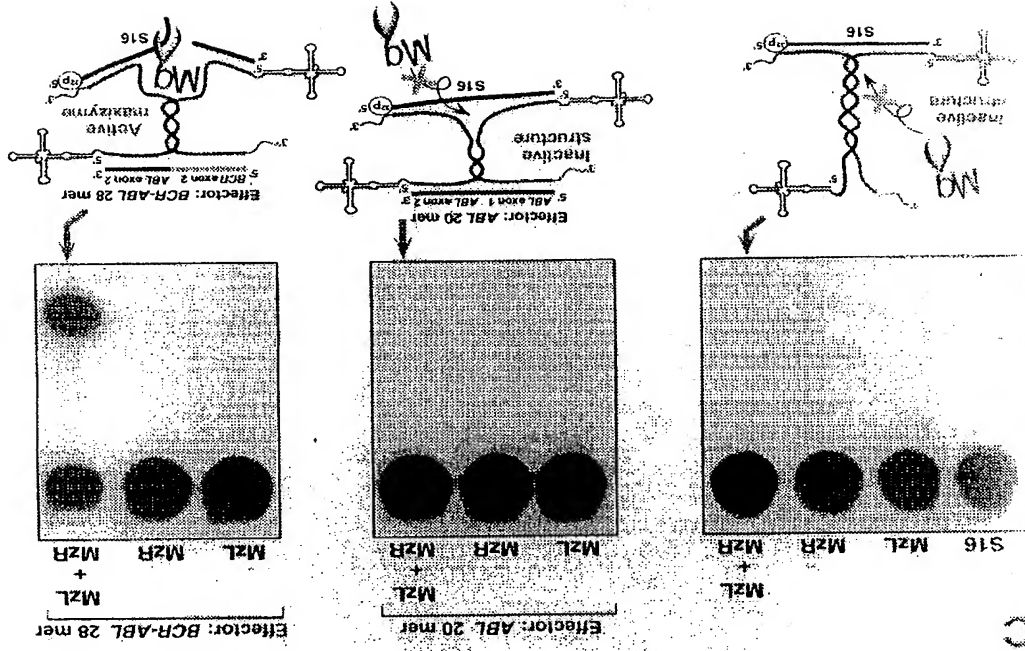


図 14

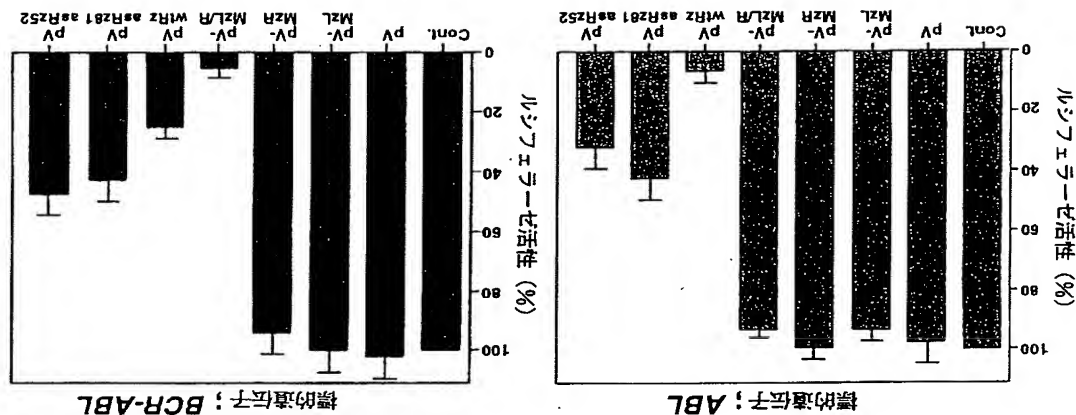


図 13

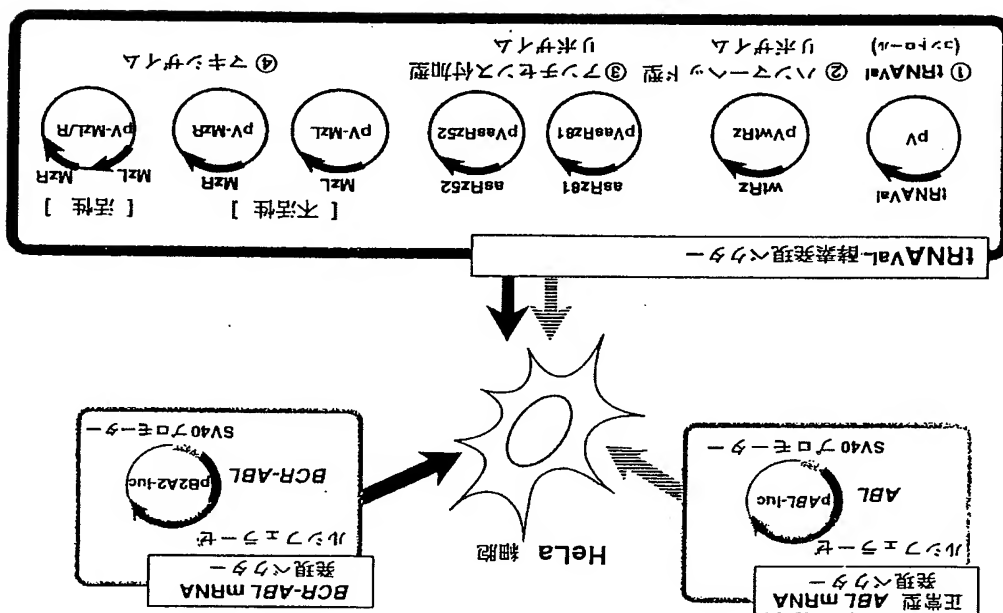
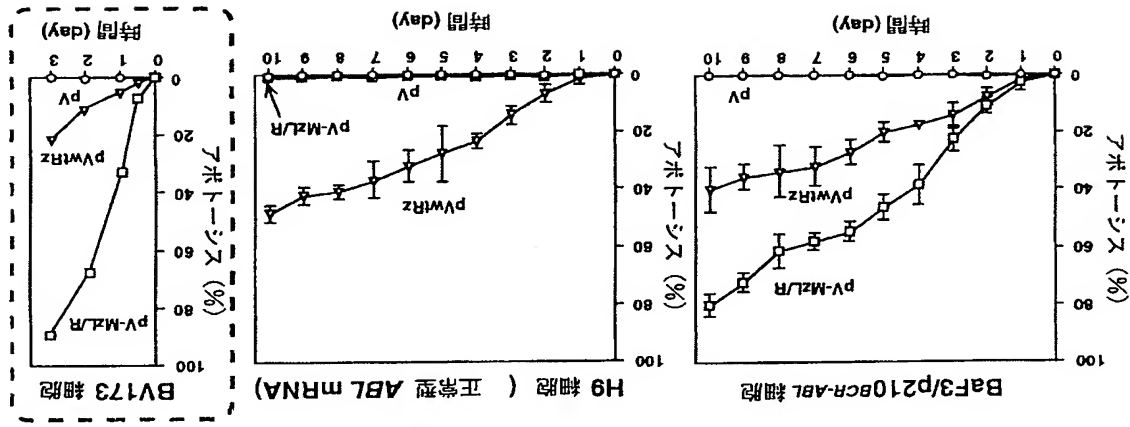


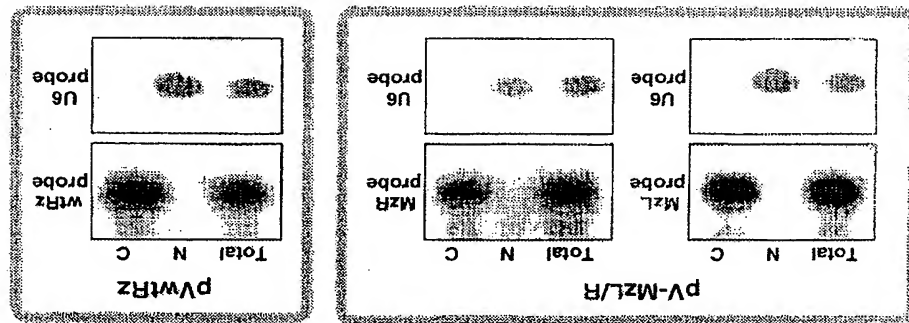


図 18



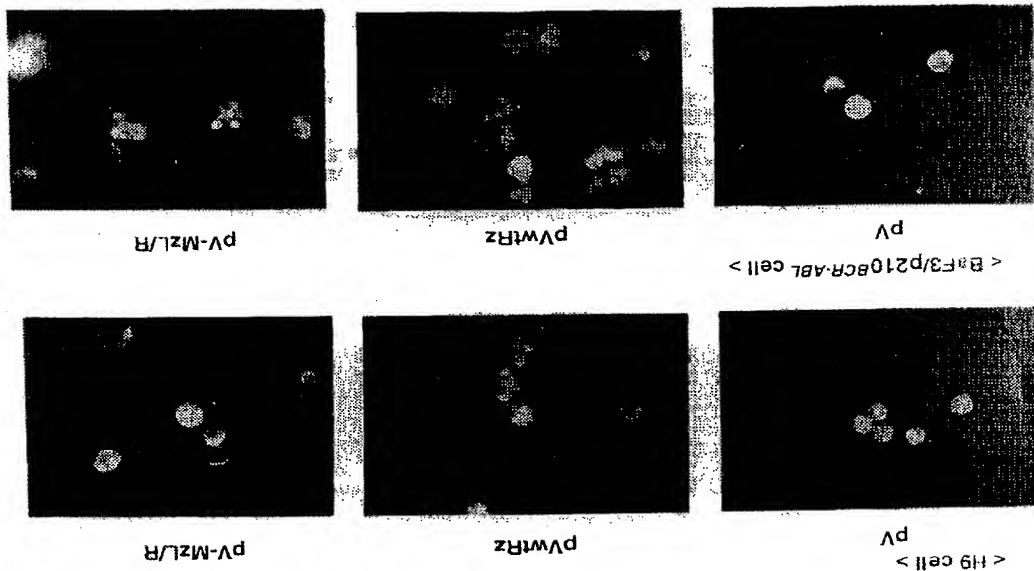
18/25

図 17



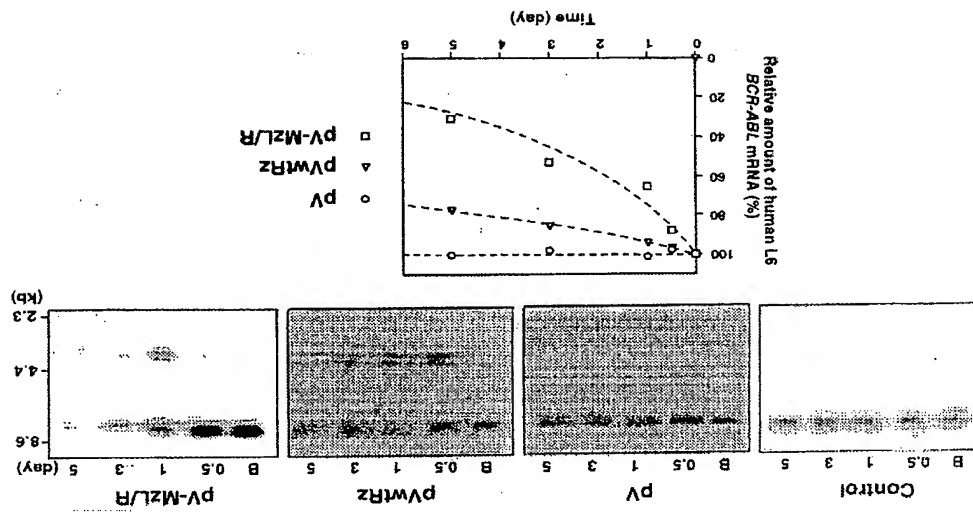
17/25

19



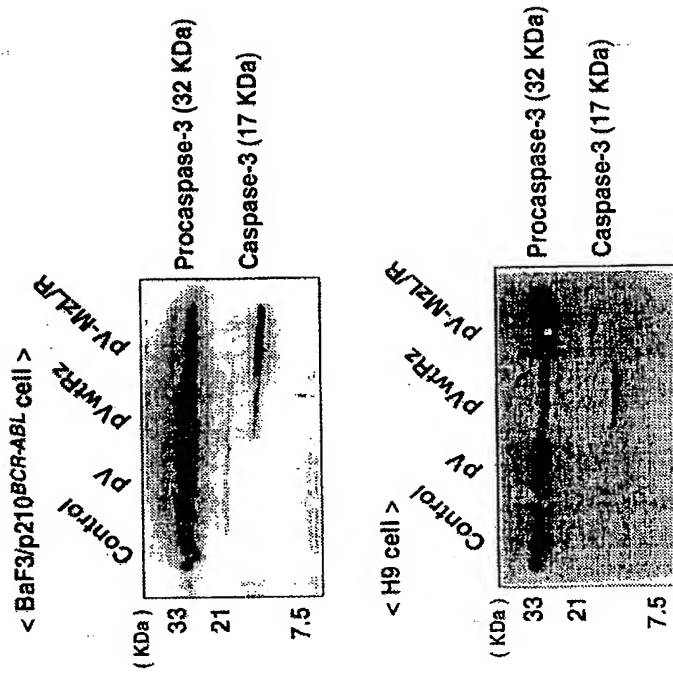
19/25

20



20/25

21



22

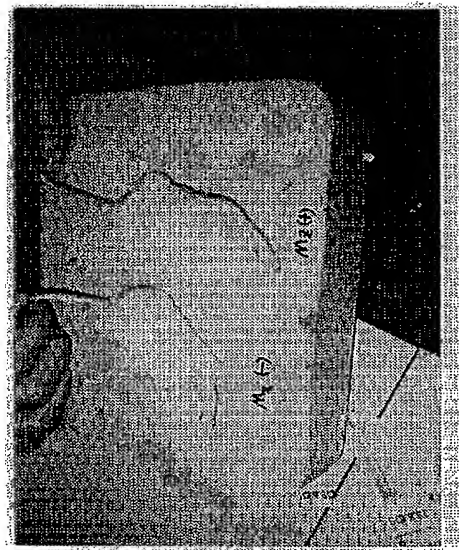




図 23

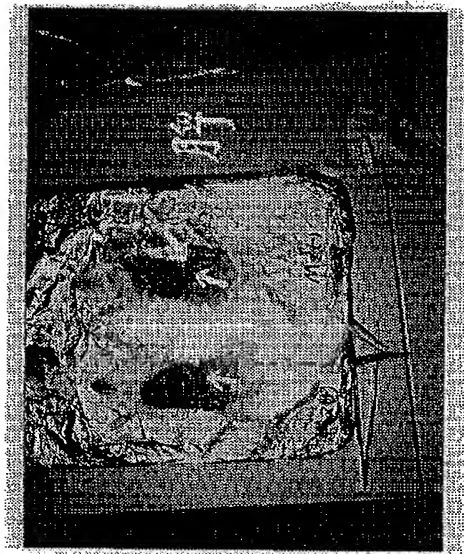
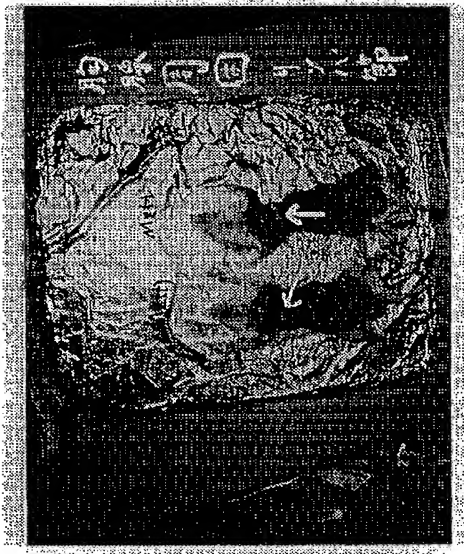


図 24



SEQUENCE LISTING

<110> DIRECTOR-GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY  
TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
<120> DIMER TYPE RIBOZYME CAPABLE OF CLEAVING SPECIFICALLY MESSENGER RNA  
RESPONSIBLE FOR CHRONIC MYELOCYTIC LEUKEMIA

<130> P98-0496

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: The nucleotide sequence of MzL

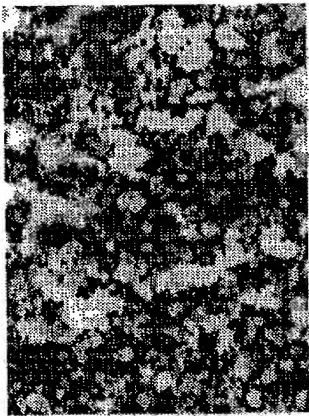
<400> 1

gaaggagcuuc uuucaugaa acccugagg

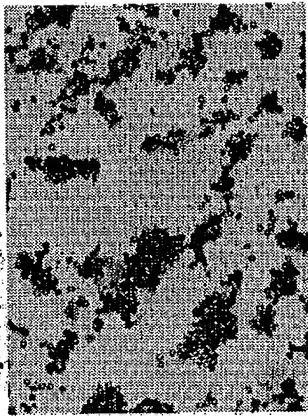
29

<210> 2

Control ; Mz(-)



Maxizyme ; Mz(+)



WO 99/46388	PCT/JP99/01187	WO 99/46388	PCT/JP99/01187
<211> 30		<220>	
<212> RNA		<223> Description of Artificial Sequence: The nucleotide sequence of	
<213> Artificial Sequence		a promoter of T7 RNA polymerase	
<220>		<400> 4	17
<223> Description of Artificial Sequence: The nucleotide sequence of MzR		taatacagact cactata	

<400> 2	30
cacucacuga ugagaguau ugauggucag	
<210> 3	
<211> 88	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

[配列表フリーテキスト]

配列番号 1 は、M z L のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 2 は、M z R のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 3 は、tRNA<sup>val</sup> のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 は、T7 RNA ポリメラーゼのヌクレオチド配列を示す。

<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: The nucleotide sequence of	
tRNA <sup>val</sup>	
<400> 3	60
accguugguu uccguagugu agugguuauc acguucgccu aacacgcgaa aggucccccgg	
uucgaacccg ggcacuaaca aaaccaac	88
<210> 4	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/01187

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/55, C12N9/22, C12Q1/34, A61K48/00, A61K38/43

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/55, C12N9/22, C12Q1/34, A61K48/00, A61K38/43

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST File (JOIS),  
DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Tomoko Kuwahara et al., "Iyakuin kaihatsu to idenshi Iyakuin to shitenno ribozyme sekkei", Idenshi Igaku, Vol. 2[3] (1998-Jul.), p.367-374	1-19
X A	Nucleic Acids Res., Vol.25[15] (1997) Kuwabara T. et al., "Comparison of the specificities and catalytic activities of hammerhead ribozymes and DNA enzymes with respect to the cleavage of BCR-ABL chimeric L6(b2a2) mRNA" p.3074-3081	1-4, 11-19 5-10
X A	Tomoko Kuwahara et al., "Idenshi hatsugen seigyohou-Daimaagata minizaimu no design to sono ouyou-", Biomedicine & Therapeutics, Vol. 31[4] (1997), p.435-441	1-4, 11, 14-19 5-10, 12, 13
E, A	Nucleic Acids Res. Vol. 26[14] (1998-Jul.) Araki M. et al., "Allosteric regulation of a ribozyme activity through ligand-induced conformational change" p.3379-3384	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 May, 1999 (07. 05. 99)

Date of mailing of the international search report

18 May, 1999 (18. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/01187

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RNA, Vol. 3 (1997) Tang J. et al., "Examination of the catalytic fitness of the hammerhead ribozyme by in vitro selection" p.914-925	1-19
A	Chemistry & Biology, Vol. 4[6] (1997) Tang J. et al., "Rational design of allosteric ribozymes" p.453-459	1-19
A	Bio/Technology, Vol. 13 (1995) Porta H. et al., "An Allosteric Hammerhead Ribozyme" p.161-164	1-19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01187

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01187

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.
- ☒
- Claims Nos.: 20-24

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The group of inventions as set forth in claims 20 to 24 pertains to methods for specifically cleaving mRNA causative of diseases *in vivo* and thus falls under the category of methods for treatment of the human body by therapy. Thus, it relates to a subject matter which this International Searching

- 2.
- ☐
- Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3.
- ☐
- Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1.
- ☐
- As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2.
- ☐
- As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

- 3.
- ☐
- As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4.
- ☐
- No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.**Continuation of Box No. I of continuation of first sheet (1)**

Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JP99/01187	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. C12N15/55, C12N9/22, C12Q1/34, A61K48/00, A61K38/43			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. C12N15/55, C12N9/22, C12Q1/34, A61K48/00, A61K38/43			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS), DDBJ/EMBL/Genbank/PIR/SwissProt/Genseq			
C. 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号	
引用文献のカテゴリ-*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	1-19	
P, X	遺伝子工学, Vol. 2[3](1998-Jul.) 桑原 知子 他 「医薬品開発と遺伝子 医薬品としてのリボザイム設計」 p. 367-374	1-19	
X A	Nucleic Acids Res., Vol. 25[15] (1997) Kuwabara T. et al. [Comparison of the specificities and catalytic activities of hammerhead ribozymes and DNA enzymes with respect to the cleavage of BCR-ABL chimeric L6 (b2a2) mRNA] p. 3074-3081	1-4, 11-19 5-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C 種の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 * 引用文献のカテゴリ- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 「O」 口頭による開示、使用、展示等に基づく文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 07.05.99		国際調査報告の発送日 18.05.99	
国際調査機関の名称及び 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関二丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JP99/01187	
C (続き) 関連すると認められる文献			
引用文献のカテゴリ-*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号	
X A	治療学, Vol. 31[4] (1997) 桑原 知子 他 「遺伝子発現制御法 —ダイマー型ミニザイムのデザインとその応用—」 p. 435-441	1-4, 11, 14-19 5-10, 12, 13	
E, A	Nucleic Acids Res. Vol. 26[14] (1998-Jul.) Araki M. et al. [Allosteric regulation of a ribozyme activity through ligand-induced conformational change] p. 3379-3384	1-19	
A	RNA, Vol. 3 (1997) Tang J. et al. [Examination of the catalytic fitness of the hammerhead ribozyme by in vitro selection] p. 914-925	1-19	
A	Chemistry & Biology, Vol. 4[6] (1997) Tang J. et al. [Rational design of allosteric ribozymes] p. 453-459	1-19	
A	Bio/Technology, Vol. 13 (1995) Porta H. et al. [An Allosteric Hammerhead Ribozyme] p. 161-164	1-19	

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)  
法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-24 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 20-24に係る発明は生体内で疾病の原因となるmRNAを特異的に切断する方法に関するものであり、これは治療による人体の処置方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づき規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出版の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第2欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出版に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部ののみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。